

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Caractérisation des fonctions de PcoA et PcoB, deux acteurs clés dans la régulation de l'homéostasie du cuivre chez *Caulobacter Crescentus*

Latora, Hélène

Award date:
2016

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

**CARACTERISATION DES FONCTIONS DE PcoA ET PcoB, DEUX
ACTEURS CLEFS DANS LA REGULATION DE L'HOMÉOSTASIE DU CUIVRE
CHEZ *CAULOBACTER CRESCENTUS***

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Hélène Latora

Janvier 2016

Caractérisation des fonctions de PcoA et PcoB, deux acteurs clefs dans la régulation de l'homéostasie du cuivre chez *Caulobacter crescentus*

LATORA Hélène

Résumé

Tous les organismes sont continuellement confrontés à différents stress provenant de l'environnement et doivent s'adapter pour survivre. Ce travail se focalise sur un stress en particulier : un stress en cuivre (Cu). Le Cu est un oligo-élément métallique essentiel, impliqué dans une grande variété de processus biologiques. Cependant, en dépit de son rôle vital, le Cu peut devenir rapidement toxique à mesure que sa concentration augmente.

Les bactéries ont développé différents systèmes pour faire face à un stress en cuivre. L'homéostasie du cuivre a été largement étudiée chez *Escherichia coli*, chez qui 3 systèmes majeurs ont été identifiés : le système Cus, le système Cue et le système Pco. Des homologues de certains de ces systèmes sont conservés chez *Caulobacter crescentus*, l'organisme d'intérêt de notre équipe.

Ce travail vise à identifier plus précisément les fonctions ainsi que la localisation subcellulaire de deux protéines impliquées dans l'homéostasie du cuivre chez *Caulobacter crescentus* : PcoA et PcoB. Plus précisément, nous voulions savoir si PcoA possède un rôle similaire à son homologue chez *E. coli*, CueO, une multicopper oxydase périplasmique oxydant les ions Cu^+ en Cu^{2+} . Nous avons également cherché à confirmer les prédictions bioinformatiques qui situent PcoB comme ancré en membrane externe. La voie par laquelle PcoB serait transporté du cytoplasme vers la membrane externe reste encore inconnue. C'est pourquoi nous nous sommes également intéressés à cette question. Il existe deux principales hypothèses de travail à ce sujet : PcoB pourrait soit emprunter la voie Sec, soit profiter du passage de PcoA via le système Tat. Par interaction avec PcoA, PcoB pourrait en effet être emporté en même temps dans le périplasme par un système de "hitchhiking". Nous proposons dans ce travail quelques pistes expérimentales pour répondre à cette question.

Le travail effectué au cours de ce mémoire aura permis de mettre au point des outils génétiques et des protocoles utiles à l'équipe de recherche. En outre, nous avons pu partiellement vérifier l'hypothèse de travail établie précédemment dans le laboratoire, confirmant les localisations subcellulaires des protéines PcoA et PcoB. Ce mémoire pose également les bases expérimentales pour l'étude de la translocation de PcoA et PcoB au travers de la membrane interne.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2016

Promoteur: J.-Y. Matroule

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Jean-Yves Matroule pour m'avoir gentiment accueillie au sein de son équipe et pour m'avoir suivie tout au long de cette période. Merci à lui pour le temps qu'il m'a consacré.

Un grand merci évidemment à mon doctorant Sébastien Gillet, pour son encadrement, ses conseils, sa disponibilité et aussi sa patience (tu savais garder ton calme malgré les conneries que je pouvais parfois dire et faire...). Merci également au reste de la BEAR team : Emeline, pour sa bonne humeur permanente et ses conseils avisés ; Lio, pour s'être chargé de la bonne ambiance (avec ses blagues parfois un peu douteuses et ses intermèdes musicaux (*j'admire tes connaissances en matière de chansons ! Même si ça ne tient pas debout...*)) ; et Françoise. Sans oublier Gwen, sans qui j'aurais moins d'anecdotes à raconter.... (Sans rancune !).

Merci aussi à tous les Uherbéemmiens et Uherbéemmiennes pour leur bonne humeur générale. Merci à tous pour les petits conseils donnés par-ci par-là. Merci à Jérôme pour m'avoir rappelé sans répit que je m'appelle Hélène... et que je suis une fille.... pas comme les autres...🎵. Merci à Severin pour m'avoir donné des petits trucs et astuces pour bien réussir mon agarose... Et merci à tous les futurs ex-mémos : Gwen, Nico (Ca y est ! On y est arrivés !), Rosapocalypse (qui s'est avérée être moins catastrophique que moi...), Hélène (non je ne parle pas de moi à la 3^{ème} personne !), Manon et Aurore. Merci à elles (et Nico) pour les bons moments passés ensemble et pour l'esprit de groupe (surtout lors des petits coups de mou et les pétages de plomb).

Je voudrais aussi remercier mes amis pour leur soutien, pour avoir toujours répondu présent quand j'en avais besoin, et pour m'avoir permis de me changer les idées, sans quoi ma santé mentale serait encore pire que ce qu'elle n'est déjà...

Un Merci tout particulier à ma famille, évidemment, qui a fait de moi ce que je suis, et qui a participé activement à ma réussite, en m'ayant soutenue et supportée même quand je râlais un peu trop (avec ou sans raisons)...

Et pour terminer je remercie tous ceux qui prendront la peine de lire ce travail. En espérant que vous trouverez le sujet aussi intéressant que moi.

Bonne lecture à tous !

« La vérité scientifique sera toujours plus belle que les créations de notre imagination et que les illusions de notre ignorance. »

Claude Bernard

Table des matières

Introduction	3
I. Interaction des êtres vivants avec l'environnement	3
a) La vie trouve toujours un chemin	3
b) L'environnement, source de stress	3
II. Oligo-éléments	5
a) Concept et définition	5
b) Importance des oligo-éléments métalliques dans le vivant	5
III. Importance du Cu chez les vivants	7
a) Les propriétés du Cu	7
b) Le Cu comme agent de la lutte antimicrobienne	7
c) Le Cu est impliqué dans de nombreux processus biologiques	9
d) Adaptation à un stress en Cu (chez les bactéries)	11
IV. <i>Caulobacter crescentus</i>	15
a) Généralités	15
b) Le cycle cellulaire de <i>Caulobacter crescentus</i>	15
c) Hypothèse de travail : PcoA est une oxydase périplasmique, PcoB est une pompe à efflux membranaire.	17
d) Le système Tat	17
Objectifs du mémoire	19
Résultats	25
I. Confirmation des résultats antérieurs	25
II. Caractérisation de PcoA et PcoB	27
a) Localisation de PcoA et PcoB	29
b) Relation localisation et fonction : Δ Tat	33
Conclusions	41
I. Confirmation des résultats antérieurs : PcoA et PcoB sont impliqués dans la résistance au Cu chez <i>C. crescentus</i>	41
II. Caractérisation de PcoA et PcoB	41
a) Fonction de PcoA et PcoB	41
b) Localisation de PcoA et PcoB	43
c) Interaction PcoA et PcoB et transport transmembranaire: Le signal Tat	43
Perspectives	45

Matériels et méthodes	49
I. Souches.....	49
II. Plasmides.....	49
III. Milieux et solutions	51
IV. Techniques.....	53
a) Courbes de croissance	53
b) Conjugaison (tri parental mating).....	53
c) Test sucrose	53
d) Transformation en souches compétentes par choc thermique	55
e) Microscopie	55
f) PCR	57
g) Electrophorèse en gel d'agarose	63
h) Purification sur gel	65
i) Extraction d'ADN plasmidique (=minipréparation).....	65
j) Restriction enzymatique	67
k) Ligation	67
l) Inactivation d'enzymes.....	69
m) <i>Western-blot</i>	69
n) Sphéroplastes.....	71
o) Fractionnement membranaire par ultracentrifugation	71
Bibliographie	75
Annexes	83
I. Annexe 1 : Le cycle cellulaire de <i>Caulobacter crescentus</i> et sa régulation	83
II. Annexe 2 : Microscopie à fluorescence des souches WT-PstS-mCherry, Δ A1500-PstS-mCherry, Δ A1200-PstS-mCherry et Δ B-PstS-mCherry	89

Introduction

Introduction

I. Interaction des êtres vivants avec l'environnement

a) La vie trouve toujours un chemin

L'environnement se définit par « *L'ensemble des éléments (biotiques ou abiotiques) qui entourent un individu ou une espèce et dont certains contribuent directement à subvenir à ses besoins (Larousse).* »

La Terre présente une grande variété d'environnements. Si certains nous paraissent très peu propices à la vie, de nombreux organismes ont su coloniser des milieux qui nous seraient hostiles. Le vivant possède en effet une grande capacité d'adaptation, lui permettant d'occuper pratiquement toutes les niches écologiques. Ainsi, le manchot empereur, par exemple, a développé des particularités morphologiques et physiologiques qui lui ont permis de survivre en Antarctique, où les températures peuvent descendre jusqu'à -80°C. Les maîtres incontestés de la colonisation restent cependant les bactéries. Leur plasticité génomique leur a permis de s'adapter à presque tous les environnements présents sur Terre. *Pseudoalteromonas arctica* a ainsi été isolée en mer de Barents à 4 °C, alors que *Acidianus convivator* ou *Pyrodictium occultum* vivent à proximité des sources chaudes océaniques, où les températures sont comprises entre 85 °C et 110 °C. *Acidithiobacillus thioxydans* survit à pH 0,5, alors que *Bacillus pseudofirmus* préfère un pH compris entre 8,5 et 10,6.

b) L'environnement, source de stress

Chaque milieu possède des facteurs biotiques et abiotiques qui lui sont propres. Toutes les espèces possèdent des seuils de tolérance particuliers pour chacun de ces facteurs. Un organisme peut donc tolérer une certaine variation des conditions de son environnement : c'est sa "valence écologique". Lorsque ces seuils de tolérance sont dépassés, l'organisme est confronté un stress, et doit soit fuir, soit y faire face.

Il est essentiel pour le vivant de mettre en place des mécanismes afin de contrer ces stress. Par exemple, si la bactérie *Escherichia coli* se retrouve confrontée à un environnement à 10°C (au lieu de son optimum à 37°C), la synthèse de protéines impliquées dans la réponse au froid sera privilégiée. La membrane plasmique deviendra plus rigide de par la modification de sa composition (le nombre d'acides gras insaturés augmente et leur longueur diminue). La machinerie de traduction sera protégée et activée par des protéines comme CspA, une chaperonne de l'ARN, et RbfA, impliquée dans la maturation des ribosomes à basse température. Le bon repliement des protéines sera supervisé par le facteur TF (Trigger Factor) qui augmentera la viabilité des cellules à faible température en permettant aux protéines de garder leur conformation (Phtadare, 2004) (Chattopadhyay, 2006).

Les sources possibles de stress sont très variées : variation de la température, de la pression, de la salinité, du pH, carence en nutriments ou présence de composés toxiques (comme les métaux lourds), par exemple. Ce travail va se focaliser sur un stress en particulier : un excès en Cuivre (Cu), oligo-élément métallique potentiellement toxique.

TENEUR DU CORPS HUMAIN

<i>ÉLÉMENTS MAJEURS</i>					
Oxygène	624,3	Carbone	211,5	Hydrogène	98,6
Azote	31,0	Calcium	19,0	Phosphore	9,5
Potassium	2,3	Soufre	1,6	Chlore	0,8
Sodium	0,8	Magnésium	0,27		
<i>OLIGO-ÉLÉMENTS</i>					
Fer	0,06	Fluor	0,037		
Zinc	0,033				
Rubidium	0,0046	Strontium	0,0046		
Brome	0,0029	Cuivre	0,001		
Vanadium	0,0003	Sélénium	0,0002		
Manganèse	0,0002	Iode	0,0002		
Molybdène	0,0001	Nickel	0,0001		
Chrome	0,00002	Cobalt	0,00002		
Uranium	0,000001	Beryllium	0,0000003		

Figure 1: Comparaison de la teneur (en g/Kg) en éléments chimiques du corps humain. On parle d'oligo-éléments pour définir les éléments qui, à faible concentration, sont nécessaires à la vie, mais qui deviennent rapidement toxiques à mesure que leur concentration augmente. Chez l'homme, l'oligo-élément le plus abondant est le fer, puis le fluor, le silicium, le zinc, le cuivre, etc... (*Collège des enseignants de Nutrition, 2011*).

II. Oligo-éléments

a) Concept et définition

La notion d'oligo-éléments définit les éléments qui, à faible concentration, sont nécessaires à la vie, mais qui deviennent rapidement toxiques à mesure que leur concentration augmente. Le fer, par exemple, sera considéré comme oligo-élément. On parle d'oligo-éléments "essentiels" lorsque l'organisme est incapable de les synthétiser et qu'il doit donc les capter dans son milieu (via les nutriments, par exemple). C'est le cas du Zinc, du Cuivre, du Chrome, du Molybdène, du Bore, du Fer et Manganèse (*Baize*). Ces oligo-éléments répondent aux critères élaborés par le scientifique gréco-américain George Cotzias : ils sont présents dans les tissus vivants à une concentration relativement constante; une carence en l'un de ces éléments provoque des anomalies structurelles et physiologiques et l'apport de l'élément seul peut prévenir ou guérir ces troubles (*Cotzias, 1967*).

b) Importance des oligo-éléments métalliques dans le vivant

Chez l'Homme, l'oligo-élément le plus abondant est le fer, avec une moyenne de 0,06 g/kilo, puis le fluor (0,037 g/kg) et le zinc (0,033 g/kg). La concentration moyenne de Cu est plus faible, et tourne autour de 1 mg/kg (*Figure 1*). Il arrive que certains oligo-éléments métalliques, dont le Cu, soient définis comme des "métaux lourds". Cependant, il s'agit d'une appellation vernaculaire et imprécise, sans définition stricte. C'est pourquoi on lui préférera dans ce travail la notion d'oligo-élément métallique.

La concentration intracellulaire des oligo-éléments est un facteur extrêmement important, car une carence comme un excès peut s'avérer toxique, voire létal. Ces composés sont impliqués dans un grand nombre de processus biologiques, et une faible perturbation de leur concentration peut avoir d'importantes répercussions sur un ensemble de mécanismes.

La majorité des oligo-éléments métalliques sont des métaux de transition, ce qui permet leur liaison à des protéines. En effet, la plupart des ions métalliques dans les cellules ne sont pas présents sous forme d'ions libres car ils seraient trop réactifs et instables et pourraient ainsi causer des dommages. Ils sont donc le plus souvent liés à une protéine, que ce soit pour leur absorption, leur transport, leur stockage ou leur fonction. Cette liaison d'un métal à une enzyme peut être spécifique et certains ions métalliques sont des cofacteurs indispensables à l'activité enzymatique (*Collège des enseignants de Nutrition, 2011*).

Il existe une grande diversité de métallo-enzymes. Il en existe par exemple plus de 200 pour le zinc. Ces enzymes sont impliquées dans de nombreuses voies métaboliques. Certains oligo-éléments, comme le cobalt, sont des constituants de certaines vitamines (la B12 dans ce cas). D'autres participent à la réponse hormonale, soit en tant que cofacteur d'enzymes impliquées dans la synthèse d'hormones, soit en participant directement à la structure de l'hormone, comme c'est le cas de l'iode pour les hormones thyroïdiennes. De nombreux oligo-éléments métalliques sont donc impliqués dans des activités biologiques. Le Cu fait partie de ceux là, et possède un rôle capital au sein de la biologie cellulaire (*Collège des enseignants de Nutrition, 2011*).

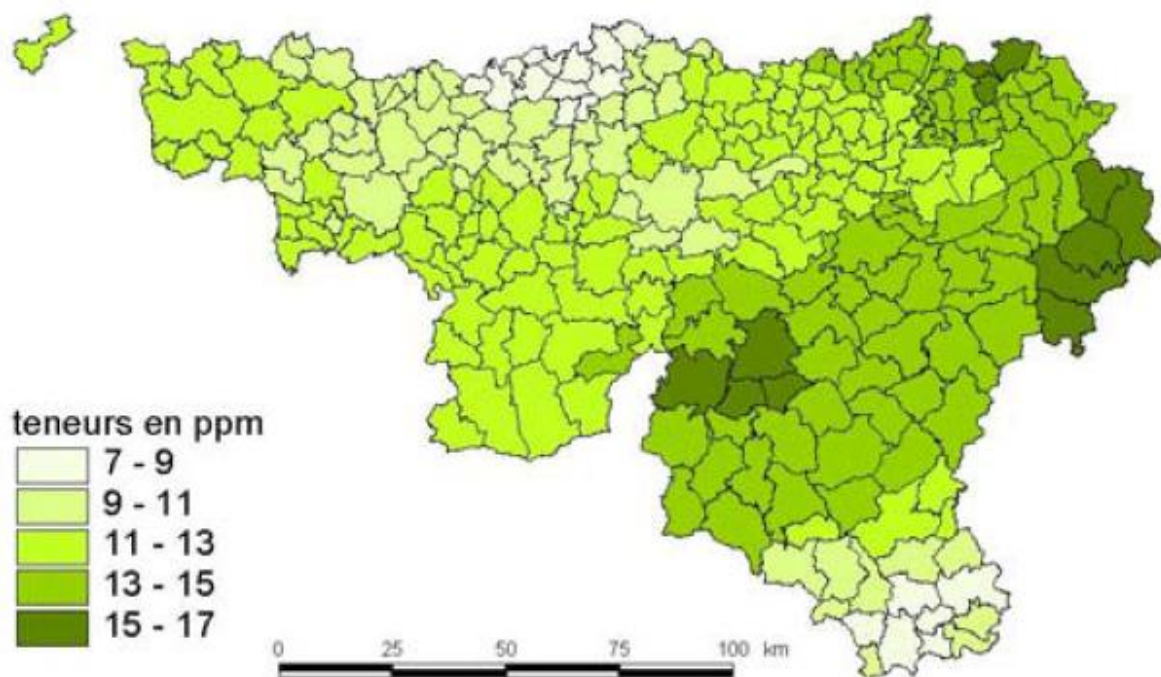


Figure 2: Teneurs (en ppm) en cuivre pour la Wallonie. La moyenne des teneurs en cuivre en Wallonie est de 13 mg/kg de matière sèche. On peut donc considérer que la Wallonie n'est que faiblement contaminée en cuivre. La concentration en cuivre dépend des propriétés naturelles des sols, mais aussi des activités humaines (*Pereira, 2007*).

III. Importance du Cu chez les vivants

a) Les propriétés du Cu

Naturellement présent dans la croûte terrestre, le Cu est un métal de transition qui peut exister sous différents états d'oxydation. Les plus fréquents sont la forme réduite (Cu^+), et la forme oxydée (Cu^{2+}). Cu^+ étant un acide de Lewis faible, il a une préférence pour les bases faibles, comme les thiols, hydrides, alkyls, cyanides et phosphines, alors que Cu^{2+} est un acide de Lewis intermédiaire, et se lie préférentiellement aux nitrates et sulfates. Le Cu est omniprésent dans la nature. On le retrouve dans l'eau à une concentration généralement comprise entre 10 et 15 $\mu\text{g/l}$, et dans les sols à environ 13 mg/kg . Cependant, cette concentration peut varier selon la nature géologique du terrain et les activités humaines. La pollution humaine est un facteur déterminant pour la présence de Cu dans l'environnement, car il est utilisé dans de nombreux domaines tels que l'ornementation (toitures d'églises, peintures), l'agriculture (engrais, fongicides), et l'industrie (conducteur de courant électrique, composants de différents alliages). En Wallonie, les différents relevés indiquent qu'il n'y a qu'une faible contamination en Cu en général (*Pereira, 2007*) (Figure 2).

Le fort potentiel rédox du Cu fait de lui un partenaire de choix pour les enzymes. Celles-ci peuvent soit être impliquées dans l'oxydation de substrats (comme l'anion superoxyde, l'ascorbate, le catéchol ou les phénolates), ou soit être d'importants transporteurs d'électrons (comme la cytochrome c oxydase, qui va transmettre les électrons à des molécules d' O_2 dans la chaîne respiratoire mitochondriale) (*Trevors & Cotter, 1990*) (*Osman & Cavet, 2008*). Cependant, ce fort potentiel rédox fait aussi du Cu une source de dommages cellulaires lorsqu'il se retrouve libre dans la cellule.

b) Le Cu comme agent de la lutte antimicrobienne

Cette cyto-toxicité est connue de manière empirique depuis longtemps. Les Egyptiens l'utilisaient déjà au 3^{ème} millénaire ACN pour son potentiel stérilisant. Les Grecs, les Romains et les Aztèques avaient remarqué ses vertus médicinales et l'utilisaient comme traitement contre les maux de tête, brûlures, vers intestinaux et infections ainsi que pour l'hygiène en général. L'utilisation du Cu en médecine s'est ensuite largement répandue au cours du 19^{ème} et 20^{ème} siècle, où il était incorporé à de nombreuses préparations pour traiter les adénites chroniques, l'eczéma, les infections tuberculeuses, la syphilis ou encore l'anémie. Des mixtures à base de Cu étaient aussi répandues sur des cultures pour lutter contre le mildiou. Le Cu était donc utilisé comme agent antimicrobien aussi bien en médecine qu'en agriculture, jusqu'à l'avènement des antibiotiques commerciaux en 1932. Cependant, avec la crise des antibiotiques actuelle, le Cu semble apparaître à nouveau comme un agent bactéricide ou bactériostatique intéressant (*Grass et al., 2011*).

Cytochrome oxidases				
<i>cbb3</i>	1	Inner membrane		Dioxygen reduction
<i>aa₃, caa₃</i>	2			
Nitrite reductase	2	Inner membrane/ periplasmic	Tat	NO ²⁻ reduction
Nitric oxide reductase	1	Inner membrane		NO reduction
Nitrous oxide reductase	4	Inner membrane/ periplasmic	Tat	N ₂ O reduction
Cu,Zn-Superoxide dismutases	1	Secreted/ periplasmic/ cytoplasmic	Sec	Dismutation of O ₂ ⁻
Plastocyanin	1	Thylakoid	Sec	Electron transfer
Azurin	1	Periplasmic	Sec	Electron transfer
Laccases	4	Periplasmic	Tat	Phenols and diamines oxidation
CueO	2-4	Periplasmic	Tat	Substrate oxidation
NADH dehydrogenase-2	1	Inner membrane		NADH oxidation
Tyrosinases	1	Secreted	Tat	Monophenol hydroxylation
Particulate methane monooxygenases	2	Membrane		Methane oxidation
Amine oxidases	1	Periplasmic/ secreted	Tat	Oxidative deamination
Polysaccharide oxygenases	1	Secreted	Tat	Cellulose oxidation

Figure 3: Enzymes bactériennes contenant du cuivre, ainsi que leur fonction et localisation. Le cuivre est présent dans de nombreuses protéines impliquées dans divers processus cellulaires, comme la croissance, la respiration, la différenciation et la survie cellulaire. La majorité des enzymes contenant du cuivre se situent dans le périplasme ou en membrane plasmique (Argüello *et al.*, 2013).

c) Le Cu est impliqué dans de nombreux processus biologiques

Le Cu est un oligo-élément métallique essentiel à tous les êtres vivants. L'organisme ne tolère que de faibles variations de concentration en Cu, sous peine d'entraîner des perturbations biologiques. Par exemple, chez l'Homme, une carence en Cu peut entraîner toutes sortes de problèmes, comme de l'anémie (*car le Cu est impliqué dans la synthèse de l'hémoglobine ainsi que dans l'absorption du fer*), de l'ostéoporose (*car le Cu est impliqué dans l'élaboration osseuse*), ou une hypersensibilité aux infections. Un excès de Cu peut également s'avérer nocif. On notera par exemple la maladie de Wilson qui se caractérise par une mauvaise excrétion du Cu, ou la maladie de Menkes qui se caractérise par un défaut d'absorption du Cu.

D'un point de vue moléculaire et cellulaire, le Cu est présent dans plus de 30 protéines. Il est impliqué dans le bon fonctionnement de divers processus cellulaires, comme la croissance et la respiration chez pratiquement tous les organismes. Parmi ces enzymes associées au Cu, on trouve la cytochrome c oxydase (*qui va transmettre les électrons à l'accepteur terminal de la chaîne de transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire*), la superoxyde dismutase (*impliquée dans la défense contre les dommages oxydatifs*), la lysyl oxydase (*requise dans le cross-linking du collagène impliqué dans l'élaboration des vaisseaux, des cartilages osseux, de la peau*), ou encore la tyrosinase (*impliquée dans la synthèse de mélanine*) (Figure 3). Le Cu est également impliqué dans la défense immunitaire innée de certains mammifères contre les infections bactériennes via la production de radicaux hydroxyles (Grass et al., 2011) (Samanovic et al., 2012).

Le Cu est donc un élément à double tranchant. Il est essentiel à la vie de nombreux organismes, mais s'avère rapidement toxique à mesure que sa concentration augmente. La forme réduite (Cu^+) est capable, *in vitro*, de causer des dommages oxydatifs. Il serait en effet impliqué dans une réaction de type Fenton ($\text{Cu}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cu}^{2+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\cdot$). Cette réaction entraîne la production de radicaux hydroxyles fortement réactifs, pouvant alors endommager les protéines, les lipides et l'ADN (Osman & Cavet, 2008) (Grass et al., 2011). La forme réduite Cu^+ peut également causer des déplacements d'ions natifs au sein de protéines. Le Cu est considéré comme étant au sommet de la série d'Irving-Williams, classant les ions métalliques selon leur compétitivité. Cela signifie qu'il a tendance à prendre la place d'autres ions métalliques au sein des protéines en raison de sa forte affinité non-spécifique. Ces déplacements d'ions natifs risquent alors de modifier la structure, et par conséquent la fonction, des protéines. Pour éviter ce problème, les métaux sont maintenus en dehors du cytoplasme, diminuant ainsi la compétition entre métaux pour un stock limité de protéines, mais favorisant la compétition entre protéines pour un stock limité de métaux (Waldron & Robinson, 2009). Ce bon appariement de la protéine avec son métal est aussi permis grâce aux chaperonnes, qui acheminent le Cu vers différentes cibles, permettant aux protéines d'obtenir leur cofacteur adéquat, notamment lorsque la concentration en Cu est faible (Osman & Cavet, 2008).

La forme oxydée Cu^{2+} , pourtant généralement considérée comme moins nocive, peut, elle aussi, s'avérer toxique. Elle peut causer des dommages oxydatifs via la production de monoxydes d'azote, fortement réactif, suite à l'oxydation des S-nitrosothiols (Gordge et al., 1995) (Singh et al., 1996). Le Cu^{2+} peut également entraîner la formation de ponts disulfures en oxydant des cystéines, ce qui peut modifier la structure native des protéines.

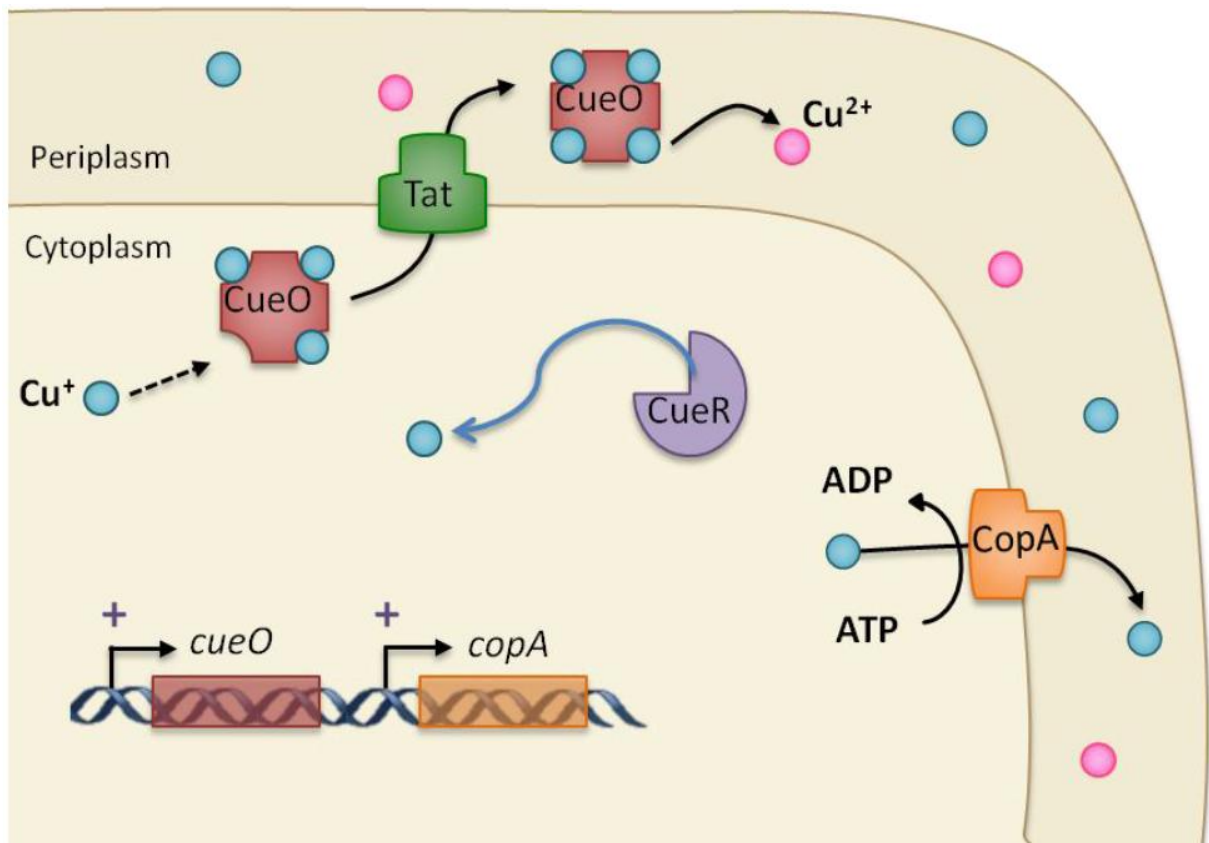


Figure 4: Chez *E. coli*, 3 systèmes de détoxification du cuivre ont été identifiés : les systèmes Cue, Cus et Pco. CueR est le senseur qui va activer la transcription des gènes *cueO* et *copA* en présence de cuivre. CopA est une ATPase de type P qui est responsable de l'efflux d'un excès de cuivre à travers la membrane cytoplasmique. CueO lie du cuivre dans le cytosol puis passe la membrane cytoplasmique via la voie Tat. Une fois dans le périplasme, CueO va oxyder Cu^+ en Cu^{2+} , considéré comme moins toxique (Grass & Rensing, march 2001) (Lee et al., 2002) (Rensing & Grass, 2003) (Osman & Cavet, 2008). (Fig: Lawarée, E.).

En général, chez les bactéries, les protéines requérant du Cu se situent au niveau du périplasma. Cette localisation est due aux propriétés toxiques du Cu, qui doit être compartimentalisé (Rensing & Grass, 2003) (Waldron & Robinson, 2009). En fonction de sa localisation subcellulaire, l'état d'oxydation du Cu sera modifié. Ainsi, dans le cytoplasme qui est un environnement réducteur, on retrouvera principalement la forme réduite Cu^+ . La forme oxydée Cu^{2+} , cependant se retrouvera principalement dans le périplasma, environnement oxydant. Il existe également de nombreuses protéines chaperonnes qui acheminent le Cu vers différentes cibles, comme cité plus haut (Osman & Cavet, 2008).

d) Adaptation à un stress en Cu (chez les bactéries)

L'homéostasie du Cu a été largement étudiée chez *E. coli*, une gamma-protéobactérie Gram négative considérée comme modèle, et chez qui 3 systèmes majeurs de détoxification du Cu ont été identifiés : les systèmes chromosomiques Cue et Cus et le système plasmidique Pco (Grass & Rensing, march 2001).

Le système Cue est le système primaire d'homéostasie du Cu, alors que le système Cus confère une tolérance au Cu en conditions de stress extrême. Le système Pco, quant à lui, n'est présent que dans certaines souches d'*E. coli* et fournit une résistance supplémentaire au Cu (Osman & Cavet, 2008).

Système Cue (Cu efflux)

Il est important pour la bactérie de garder une concentration intracellulaire en Cu la plus constante possible. Chez *E. coli*, elle est en moyenne de 10 μM , ce qui équivaut à environ 10^4 atomes par cellule. Lorsque cette concentration augmente, le senseur CueR active la transcription des gènes *cueO* et *copA*. CueO est une multicopper oxydase périplasmique, et CopA est une ATPase membranaire de type $\text{P}_{1\text{B}}$ exporteur de Cu (Rensing & Grass, 2003) (Osman & Cavet, 2008) (Figure 4).

CueR est un senseur et facteur de transcription de la famille MerR (Mercury-sensing Regulator) (Outten et al., 2000). Les protéines de cette famille se caractérisent par leur liaison à un promoteur cible en présence et en absence du métal effecteur. Lorsque ce dernier est présent, le facteur de transcription pourra activer allostériquement l'initiation de la transcription en réalignant les séquences de reconnaissance de l'ARN polymérase anormalement espacées. A l'inverse, s'il n'y a pas de métal, la protéine va causer une répression. CueR reconnaît le Cu mais aussi d'autres métaux comme l'argent et l'or (Stoyanov et al., 2000). C'est un senseur extrêmement sensible, ayant un seuil de détection de 10^{-21} molaire, soit une sensibilité de l'ordre d'un atome de Cu libre par cellule (Rensing & Grass, 2003) (Osman & Cavet, 2008).

CueO est une multi-copper oxydase fixant 4 atomes de Cu dans le cytoplasme puis traversant la membrane cytoplasmique via la voie Tat. Une fois dans le périplasma, elle oxydera le Cu^+ en Cu^{2+} , considéré comme moins toxique. Durant le processus d'oxydation du substrat, quatre électrons du substrat sont transférés vers un accepteur : le dioxygène. Ce dernier sera alors converti en eau, selon la formule ($4 \text{Cu}^+ + 2 \text{O}_2 \rightarrow 4\text{Cu}^{2+} + 2 \text{H}_2\text{O}$). Cela signifie que ces oxydases ont besoin d'oxygène pour fonctionner. Ainsi, elles sont inactives en anaérobiose (Grass & Rensing, july 2001) (Rensing & Grass, 2003) (Osman & Cavet, 2008).

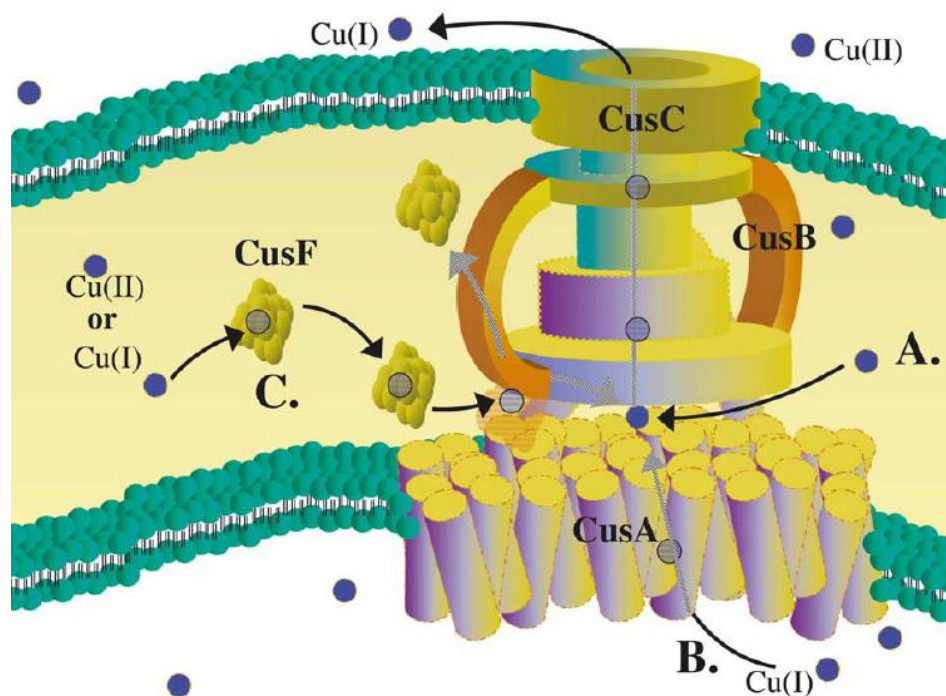


Figure 5: Le système Cus (Cu sensing) confère une tolérance au cuivre seulement en conditions de stress extrême : lorsque le système Cue est dépassé, endommagé ou en anaérobiose. Ce système n'est présent que chez les Gram-, qui doivent protéger leur périplasm, en plus de leur cytoplasme, des dommages induits par des métaux. CusR/S est le système senseur qui va détecter et induire l'expression de l'opéron *cusCBFA*. Ce dernier va constituer un canal qui va expulser le cuivre vers le milieu extracellulaire. Il est composé de CusC (protéine de la membrane externe), CusB (protéine périplasmique ancrée en membrane cytoplasmique) et CusA (protéine responsable de l'export du cuivre en échange de protons). Il y a également CusF, une protéine chaperonne qui va lier un Cu^+ périplasmique et l'amener vers le complexe (Rensing & Grass, 2003).

Function of plasmid-encoded copper resistance^a and chromosomal homologs in *E. coli*

Homologs	Localization	Function
PcoA	CueO	Periplasm, monomeric
PcoB	–	Outer membrane
PcoC	YobA ^b	Periplasm, dimeric?
PcoD	YebZ ^b	Inner membrane
PcoE	–	Periplasm
PcoR	CusR	Cytoplasm
PcoS	CusS	Inner membrane

^aPlasmid pRJ1004 carries the *pco* determinant [110].

^bYobA (P76279) and YebZ (P76278) are putative ORFs located on the *E. coli* chromosome.

Figure 6: Le système Pco, présent que chez certaines souches de bactéries, est constitué de 7 gènes *pcoABCDRE*. PcoA et PcoB suffisent pour apporter une résistance partielle au cuivre. Il faut alors ajouter PcoC et PcoD pour obtenir une résistance complète (Rensing & Grass, 2003).

CopA est une ATPase de type P_{1B} constituée de 8 hélices transmembranaires formant un canal par lequel le Cu pourra être exporté du cytosol vers le périplasma, où il sera oxydé par CueO. CopA est active en aérobie et anaérobie, contrairement à CueO. CopA peut exercer son activité ATPase (catalysant l'hydrolyse de l'ATP en un intermédiaire acylphosphate) en présence de Cu⁺ ou Ag⁺, mais pas Cu²⁺, Zn²⁺ ou Co²⁺ (Rensing *et al.*, 2000) (Rensing & Grass, 2003) (Osman & Cavet, 2008).

Système Cus (Cu sensing)

Le système Cus est activé uniquement lorsque le système Cue est saturé, endommagé, ou en condition anaérobie et qu'il ne peut alors plus réguler efficacement la concentration en Cu. Ce système n'est présent que chez les Gram négatives (Rensing & Grass, 2003).

Un excès de Cu⁺ dans le périplasma sera reconnu par CusR/S, un système senseur à deux composantes. CusS, ancré en membrane cytoplasmique, est le senseur qui détectera les atomes de Cu dans le périplasma. CusR est le régulateur qui induira l'expression de l'opéron *cusCBFA*. Les protéines codées par ce dernier constituent un canal qui expulsera le Cu directement du cytoplasme vers le milieu extracellulaire. Il est composé de CusC (protéine de la membrane externe), CusB (protéine périplasmique ancrée en membrane cytoplasmique) et CusA [protéine de la famille des antiports à protons RND (*Resistance Nodulation cell Division*) responsable de l'export du Cu en échange de protons]. CusF (petite protéine chaperonne de 10 kDa) liera un seul Cu⁺ (ou Ag⁺) périplasmique et le transférera vers le complexe CusABC. (Grass & Rensing, march 2001) (Rensing & Grass, 2003) (Osman & Cavet, 2008) (Figure 5).

Système Pco

En plus des deux systèmes décrits précédemment, certaines souches d'*E. coli* possèdent un système complémentaire pour l'homéostasie du Cu. Il s'agit du système plasmidique Pco, encore assez peu caractérisé (Rensing & Grass, 2003). C'est un système inductible, activé par le senseur à deux composantes PcoRS (le senseur PcoS active, en présence de Cu, PcoR qui, à son tour, active la transcription de l'opéron *pcoABCD* (Munson *et al.*, 2000)). Le système Pco interviendrait lors d'un stress modéré, activé à des concentrations en Cu plus élevées que pour le système Cue, mais moins que pour le système Cus, activé lors de stress extrême. Le système Pco est codé par un opéron de 7 gènes : *pcoABCDRSE* (Figure 6). Les protéines PcoA et PcoB sont suffisantes pour fournir une résistance partielle au Cu. Il faut cependant PcoC et PcoD pour apporter une résistance complète (Lee *et al.*, 2002) (Rensing & Grass, 2003) (Osman & Cavet, 2008).

PcoA est la protéine centrale du système Pco. C'est une multi-copper oxydase de 605 acides aminés (66 kDa), homologue à CueO. PcoA possède également un motif Tat qui lui permet de traverser la membrane cytoplasmique afin d'oxyder le Cu⁺ en Cu²⁺ dans le périplasma (Lee *et al.*, 2002) (Rensing & Grass, 2003).

PcoB (296 acides aminés, 33 kDa) est encore très peu caractérisée, même chez des modèles comme *E. coli*, mais des prédictions bioinformatiques suggèrent qu'elle pourrait être une protéine de la membrane externe (Lee *et al.*, 2002) (Rensing & Grass, 2003). Notons que PcoB n'est pas présent chez toutes les bactéries possédant le système Pco (comme c'est le cas pour *Sinorhizobium meliloti* qui possède un système Pco mais pas PcoB).

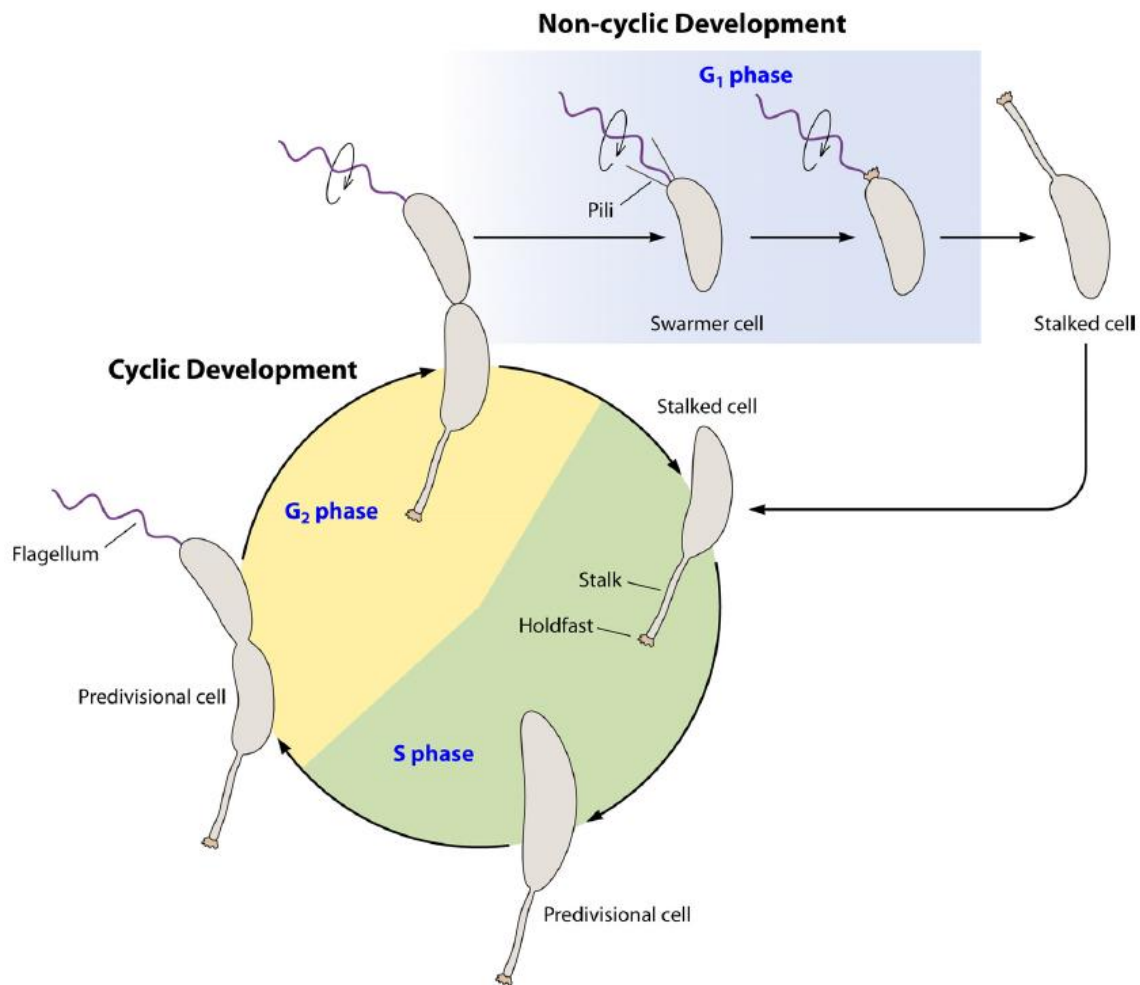


Figure 7: Cycle cellulaire de *Caulobacter crescentus*. Le cycle débute avec une cellule sessile pédonculée (stalked cell) qui entre en phase S et devient une cellule prédivisionnelle. La cellule entre ensuite en phase G₂ durant laquelle un flagelle et 2 pili sont produits au pôle opposé au pédoncule. A la fin de cette phase G₂, il y a une division cellulaire qui va générer 2 cellules de morphotypes différents : une cellule fille nageuse flagellée (swarmer cell), et la cellule pédonculée de départ. La cellule pédonculée peut recommencer un cycle alors que la cellule nageuse ne peut se diviser. Cependant, la cellule nageuse peut se différencier en cellule pédonculée pour pouvoir entrer dans le cycle à nouveau (Curtis & Brun, 2010).



Figure 8: Peptide signal Tat (chez *E. coli*). Les protéines doivent présenter un peptide signal pour passer via le système Tat. Ce peptide est composé de 38 acides aminés divisés en 3 domaines : le domaine N-terminal chargé positivement (n-region, en rose), le domaine hydrophobe (h-region, en bleu) et le domaine C-terminal (c-region, en jaune). La séquence consensus est encadrée : Ser/Thr, Arg, Arg, X, Phe, Leu, Lys (où X représente n'importe quel acide aminé polaire). La ligne verticale pointillée représente le site de clivage de la peptidase LepB (Lee et al., 2006).

Les fonctions de PcoC et PcoD ne sont pas encore connues, mais il semblerait qu'ils agissent conjointement. PcoC est une protéine périplasmique de 126 acides aminés qui lierait un atome de Cu (Cu^+ ou Cu^{2+}) pour le céder à PcoA ou/et à PcoD, protéine de la membrane interne (Lee et al., 2002) (Rensing & Grass, 2003).

PcoE est périplasmique et permettrait une séquestration du Cu en attendant l'induction et la mise en place des autres protéines du système Pco. Ceci permettant de minimiser les effets toxiques du Cu. PcoE est sous le contrôle de CusRS, alors que PcoABCD est contrôlé par PcoRS (Munson et al., 2000) (Lee et al., 2002).

La bactérie d'intérêt du laboratoire, *Caulobacter crescentus*, possède le système PcoAB, homologue de CueO et du système Pco de *E. coli*. Nous nous focaliserons dans ce travail sur le système PcoAB de *C. crescentus*.

IV. *Caulobacter crescentus*

a) Généralités

C. crescentus est une alpha-protéobactérie Gram négative vivant principalement dans les milieux aquatiques oligotrophes. Il s'agit d'une bactérie pionnière, connue pour sa faculté à coloniser rapidement des environnements pollués, ce qui suggère qu'elle possède de nombreux mécanismes d'adaptation à toutes sortes de composés toxiques (Poindexter, 1981).

Une particularité de cette bactérie est son cycle cellulaire asymétrique générant deux morphotypes différents: une cellule nageuse (« swarmer cell ») et une cellule pédonculée sessile (« stalked cell »). La première, plus petite, possède un flagelle ainsi que deux pili à l'un de ses pôles. La deuxième, plus grande, ne possède pas de flagelle mais un prosthèque, ou pédoncule, consistant en une fine extension de l'enveloppe cellulaire, à l'extrémité duquel se trouve un « holdfast » qui permet l'adhésion au substrat. Les exopolysaccharides permettant l'adhésion au substrat sont considérés comme étant une des substances collantes les plus puissantes que l'on puisse retrouver dans la nature (Curtis & Brun, 2010) (Tsokos & Laub, 2012) (Kirkpatrick & Viollier, 2012).

b) Le cycle cellulaire de *Caulobacter crescentus*

Caulobacter possède un cycle cellulaire particulier qui fait de cette bactérie un modèle pour les études sur le développement cellulaire (Figure 7). Au cours du cycle cellulaire, la cellule pédonculée va entrer en phase S, durant laquelle son ADN va se répliquer. La cellule va s'allonger, devenant alors une cellule prédivisionnelle. Un flagelle va être synthétisé au pôle opposé au pédoncule, générant ainsi, après division, la cellule fille nageuse. Cette dernière, cependant, ne peut répliquer son ADN directement. Elle devra d'abord se différencier en cellule pédonculée avant de pouvoir, à son tour, entrer dans le cycle cellulaire. Il n'y a donc que la cellule sessile qui possède une phase cyclique car elle revient à son état initial et peut recommencer directement les étapes de division (Curtis & Brun, 2010) (Tsokos & Laub, 2012) (Kirkpatrick & Viollier, 2012). (Pour plus d'informations sur le cycle cellulaire et sa régulation : voir annexe I).

The thirty six known or predicted Tat substrates in <i>E. coli</i> K-12.						
Protein	Description	Signal peptide used for export	Is a C-terminal transmembrane helix present?	Bound cofactor(s)	Possible Tat signal peptide-binding chaperone(s)	Has Tat targeting been experimentally confirmed?
Proteins with complex multiatom cofactors ^a						
DmsA	DMSO reductase α -subunit	DmsA	No	MGD, [4Fe-4S]	DmsD	Yes
DmsB	DMSO reductase β -subunit	DmsA	No	4 \times [4Fe-4S]	DmsD	Yes
FdnG	Nitrate-inducible formate dehydrogenase α -subunit	FdnG	No	MGD, [4Fe-4S]	FdhE	Yes
FdnH	Nitrate-inducible formate dehydrogenase β -subunit	FdnG	Yes	4 \times [4Fe-4S]	FdhE	Yes
FdoG	Formate dehydrogenase-O α -subunit	FdoG	No	MGD, [4Fe-4S]	FdhE	No
FdoH	Formate dehydrogenase-O β -subunit	FdoG	Yes	4 \times [4Fe-4S]	FdhE	No
HyaA	Hydrogenase-1 small subunit	HyaA	Yes	2 \times [4Fe-4S], [3Fe-4S]	HyaE, HyaF	Yes
HyaB	Hydrogenase-1 large subunit	HyaA	No	[Ni-Fe(CN) ₂ CO]	HyaE, HyaF	Yes
HybA	Electron transfer to hydrogenase-2	HybA	No	4 \times [4Fe-4S]	–	No
HybC	Hydrogenase-2 large subunit	HybO	No	[Ni-Fe(CN) ₂ CO]	HybE	Yes
HybO	Hydrogenase-2 small subunit	HybO	Yes	2 \times [4Fe-4S], [3Fe-4S]	HybE	Yes
NapA	Periplasmic nitrate reductase	NapA	No	MGD, [4Fe-4S]	NapD	Yes
NapG	Electron transfer to periplasmic nitrate reductase	NapG	No	4 \times [4Fe-4S]	–	No
NrfC	Electron transfer to periplasmic nitrite reductase	NrfC	No	4 \times [4Fe-4S]	–	No
TorA	TMAO reductase	TorA	No	MGD	TorD	Yes
TorZ	TorA homologue	TorZ	No	MGD	TorD/YcdY	No
YagR	Xanthine dehydrogenase family domain homologue	YagT	No	MCD?	YagQ	No
YagS	Xanthine dehydrogenase family domain homologue	YagT	No	FAD	YagQ	No
YagT	Xanthine dehydrogenase family domain homologue	YagT	No	2 \times [2Fe-2S]	YagQ	No
YdhX	Iron-sulfur protein	YdhX	No	4 \times [4Fe-4S]	–	No
YedY	Sulfite oxidase superfamily homologue	YedY	No	Molybdopterine	–	No
YnfE	DmsA homologue	YnfE	No	MGD, [4Fe-4S]	DmsD	No
YnfF	DmsA homologue	YnfF	No	MGD, [4Fe-4S]	DmsD	No
YnfG	DmsB homologue	YnfE or YnfF	No	4 \times [4Fe-4S]	DmsD	No
Proteins that seem to lack complex multiatom cofactors ^b						
AmiA	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	AmiA	No	Metal ions?	–	Yes
AmiC	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	AmiC	No	Metal ions?	–	Yes
CueO	Multicopper oxidase linked to copper resistance	CueO	No	Cu ions	–	Yes
FhuD	Ferrichrome-binding protein	FhuD	No	Fe(III) hydroxamates (reversibly)	–	Yes
MdoD (OpgD)	Involved in osmoregulated periplasmic glucan biosynthesis	MdoD	No	?	–	Yes
SufI	Multicopy suppressor of an <i>ftsI</i> mutation	SufI	No	None?	–	Yes
YaeI	Probable metallo-phosphoesterase	YaeI	No	Metal ions?	–	No
YahJ	Probable metallo-hydrolase	YahJ	No	Metal ions?	–	No
YcbK	Unknown	YcbK	No	?	–	No
YcdB	Unknown; structural gene overlaps that of YcdO	YcdB	No	?	–	No
YcdO	Unknown; structural gene overlaps that of YcdB	YcdO	No	?	–	No
WcaM	Coded in colon acid biosynthetic gene cluster; possible lyase	WcaM	No	?	–	Yes

Figure 9 : Certaines protéines n'ont pas de peptide signal permettant leur passage par la voie Tat. Elles utilisent alors le « hitchhiking » pour passer la membrane, c'est-à-dire qu'elles profitent du passage d'autres protéines qui possèdent ce peptide signal pour s'y complexer et être transloquées. Dans ce tableau on peut voir les 36 substrats d'*E. coli* qui utilisent la voie Tat. 8 d'entre eux ne possèdent pas de peptide signal (DmsB, FdnH, FdoH, HyaB, HybC, YagR, YagS, YnfG); ils possèdent le nom de leur partenaire dans ce tableau, dans la colonne « signal peptide used for export » (*Berks et al., 2005*).

c) Hypothèse de travail : PcoA est une oxydase périplasmique, PcoB est une pompe à efflux membranaire.

Des études précédemment menées dans le laboratoire d'accueil ont mis en évidence l'implication de deux protéines de *C. crescentus*, PcoA et PcoB, dans la résistance au Cu. Notre hypothèse de travail, basée sur des prédictions bioinformatiques, sur la littérature concernant les protéines homologues présentes chez *E. coli*, et sur les premiers résultats obtenus, suggère que PcoA serait une oxydase périplasmique. Elle oxyderait le Cu^+ en Cu^{2+} , considéré comme moins toxique. PcoB se situerait en membrane externe et jouerait un rôle dans l'expulsion du Cu dans le milieu extracellulaire. Dans les deux cas, ces protéines doivent être transportées d'une manière ou d'une autre depuis le cytoplasme (où elles sont produites) vers le périplasme. Le passage des protéines de part et d'autre de la membrane interne peut se faire principalement via 2 systèmes : le système Tat (Twin-Arginine Translocation) et le système Sec (general Secretory). Dans le cas de PcoA, on note la présence de la séquence d'adressage consensus propre au signal Tat, ce qui suggère qu'elle emprunte cette voie pour passer la membrane cytoplasmique. PcoB, en revanche, ne possède pas un tel signal. Les outils bioinformatiques automatisés ne prédisent ni signal Tat ni signal Sec, cependant une analyse manuelle révèle une séquence génétique relativement proche d'un signal Sec. Son moyen de translocation reste donc incertain.

d) Le système Tat

Le système Tat permet le passage de protéines repliées ou partiellement repliées, alors que le système Sec ne transporte que les protéines non repliées (Berks *et al.*, 2005) (Lee *et al.*, 2006). Certaines protéines ne peuvent atteindre leur conformation native dans le périplasme, car ce dernier possède des propriétés physico-chimiques très différentes de celles du cytoplasme. Le passage en conformation repliée par la voie Tat confère également une résistance à certaines protéases, comme DegP, qui cible les protéines non-repliées. En outre, le repliement dans le cytoplasme permet également l'interaction des protéines avec des chaperonnes qui vont empêcher leur agrégation. Ceci explique donc pourquoi certaines protéines emploient la voie Tat alors que celle-ci est plus coûteuse en termes de temps et d'énergie (Lee *et al.*, 2006).

Le système Tat est présent chez la majorité des bactéries (Gram négatives et positives), chez les archées et chez les plantes, mais pas chez les animaux. Il est plus ou moins sollicité en fonction de l'organisme. Chez certaines bactéries (comme chez *E. coli* et *B. subtilis*) il n'est que rarement utilisé alors que chez d'autres (comme *H. volcanii*) il est essentiel à leur survie. Par exemple, l'archée *Halobacterium sp.* utilise ce système pour l'exportation de plus de 90 % de ses protéines, contre seulement 6 % chez *E. Coli* (Lee *et al.*, 2006).

Afin de passer par la voie Tat, les protéines doivent présenter un peptide signal, composé de 38 acides aminés (24 pour le système Sec) divisés en 3 domaines : le domaine N-terminal chargé positivement (région n), le domaine hydrophobe (domaine h), et le domaine C-terminal (région c) (Lee *et al.*, 2006) (Figure 8). Ce peptide signal comporte une séquence consensus, très conservée : Ser/Thr-Arg-Arg-X-Phe-Leu-Lys (où X représente n'importe quel acide aminé polaire). Le dipeptide Arg est invariable, et donne son nom au système (Berks *et al.*, 2005) (Lee *et al.*, 2006). Cependant, il a été remarqué que certaines protéines (8 chez *E. coli*) pouvaient emprunter la voie Tat sans peptide signal. Elles profitent en fait d'autres protéines possédant ce signal Tat, et par interaction avec elles, sont emportées en même temps

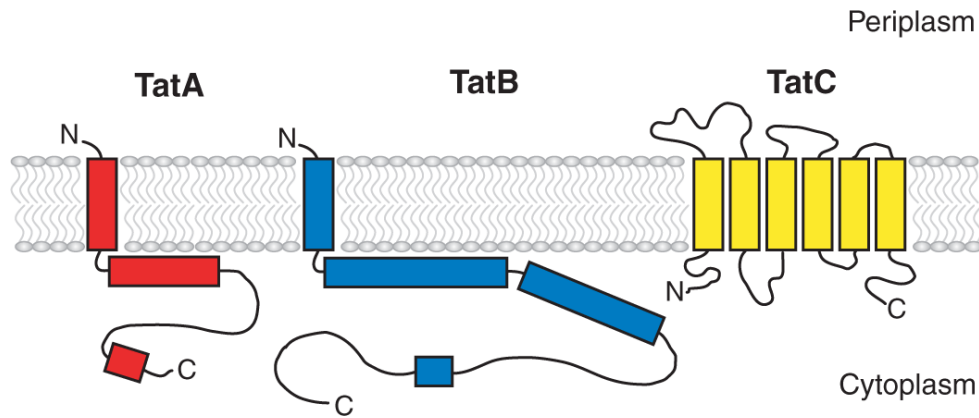


Figure 10: Chez *E. coli*, le système Tat contient 3 composants: TatA (rouge), TatB (bleu) et TatC (jaune). Le nombre de copie pour chaque gène varie selon l'organisme (Lee et al., 2006).

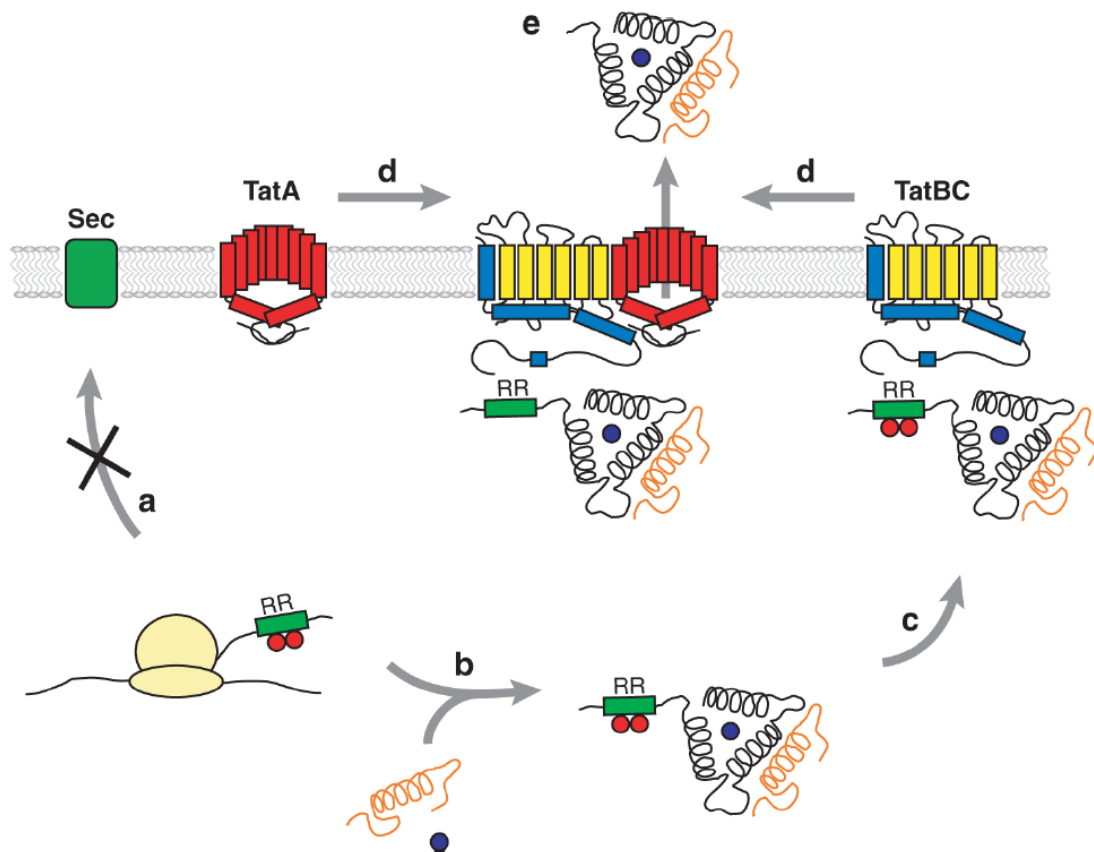


Figure 11: Modèle de translocation d'une protéine via le système Tat. (a) Lorsqu'une protéine vient d'être produite, et qu'elle doit passer la membrane sous sa conformation repliée, elle utilise le système Tat. Pour cela, elle possède un peptide signal qui va lui permettre d'être reconnue par le système Tat. Il y a également des chaperonnes (disques rouges) Tat-spécifiques qui vont empêcher le passage de la protéine tant qu'elle n'a pas incorporé son cofacteur. Ces chaperonnes vont se fixer et ainsi masquer la séquence consensus, ce qui empêche sa reconnaissance par la machinerie de translocation. (b) Une fois la protéine repliée, les cofacteurs viennent se fixer, ce qui permet le détachement des chaperonnes qui masquaient le peptide signal. (c) La protéine est reconnue par TatC au niveau de son peptide signal. (d) Le complexe TatBC va ensuite s'associer avec TatA, de façon dépendante de la force proton-motrice. (e) TatA constitue un canal par lequel va passer la protéine. Une fois dans le périplasm, la peptidase LepB va cliver le peptide signal, libérant la protéine mature dans le périplasm (Lee et al., 2006).

dans le périplasma. Ce système de "hitchhiking" a déjà été montré notamment pour HybC / HybO, des hydrogénase d'*E. coli*, ou SoxY/Z impliquée dans l'oxydation des thiosulfates chez *paracoccus* (Lee et al., 2006) (Figure 9).

Chez *E. coli*, le système Tat contient 3 composants : TatA, TatB et TatC (Figure 10). TatA et TatB présentent une séquence très proche, mais leur fonction est très différente: TatA forme le pore de translocation alors que TatB, non-essentiel chez *E. coli*, sert d'intermédiaire entre TatA et TatC. Ce dernier est l'acteur du système qui est le mieux conservé entre les différentes souches bactériennes. Il s'agit de la protéine qui va reconnaître le motif consensus de la protéine substrat et qui servira de point d'amarrage. Lorsqu'une protéine repliée doit passer la membrane, le complexe TatBC s'associe avec TatA qui constituera le canal par lequel vont passer les protéines (Figure 11). Une fois que la protéine est passée à travers le canal formé par TatA et se retrouve dans le périplasma, le peptide signal est clivé par la peptidase LepB (Figure 12), également présente dans le système Sec. L'énergie servant à la translocation des protéines provient principalement du gradient électrochimique (Berks et al., 2005).

Notons que le canal du système Tat est plus large (70 Å) que celui du système Sec (14 Å), car une protéine repliée est généralement plus volumineuse qu'une protéine dépliée. Chez *E. coli*, la majorité des protéines utilisant la voie Tat sont des protéines redox contenant un cofacteur. La liaison de leur cofacteur, pour la plupart de ces enzymes, a lieu dans le cytoplasme. Pour éviter que la protéine ne passe la membrane avant l'incorporation de son cofacteur, il existe des chaperonnes, telles que DmsD et TorD, qui vont masquer le peptide signal, empêchant alors la reconnaissance de la protéine par la machinerie de translocation tant que le cofacteur ne sera pas lié à la protéine. Ces chaperonnes pourront se détacher une fois que le cofacteur se sera incorporé à la protéine, libérant alors le signal de la protéine qui pourra être reconnue puis transloquée (Lee et al., 2006) (Berks et al., 2005) (Figure 13).

Objectifs du mémoire

L'objectif de ce mémoire était d'identifier plus précisément les fonctions de PcoA et PcoB chez *C. crescentus* ainsi que leur localisation subcellulaire. Pour cela, nous nous sommes basés sur les connaissances déjà acquises sur les homologues de PcoA et PcoB chez *E. coli* (qui sont CueO et PcoAB), et sur les prédictions bioinformatiques. Nous souhaitons apporter des éléments de réponses aux questions relatives au fonctionnement de ces deux protéines : PcoA est-il fonctionnellement l'homologue de CueO d'*E. coli* ? Est-il transloqué du cytoplasme vers le périplasma par le système Tat ? Emmène-t-il PcoB avec lui ou PcoB passe-t-il dans le périplasma par une autre voie, telle que la voie Sec ?

Nous avons d'abord essayé de confirmer certains résultats préliminaires obtenus précédemment par l'équipe de recherche, et avons ensuite tenté de répondre à ces questions grâce à des approches biochimiques, basées sur du fractionnement cellulaire et de l'immunodétection. Nous avons mis au point les outils génétiques et les protocoles nécessaires avant de passer à l'approche expérimentale à proprement parler.

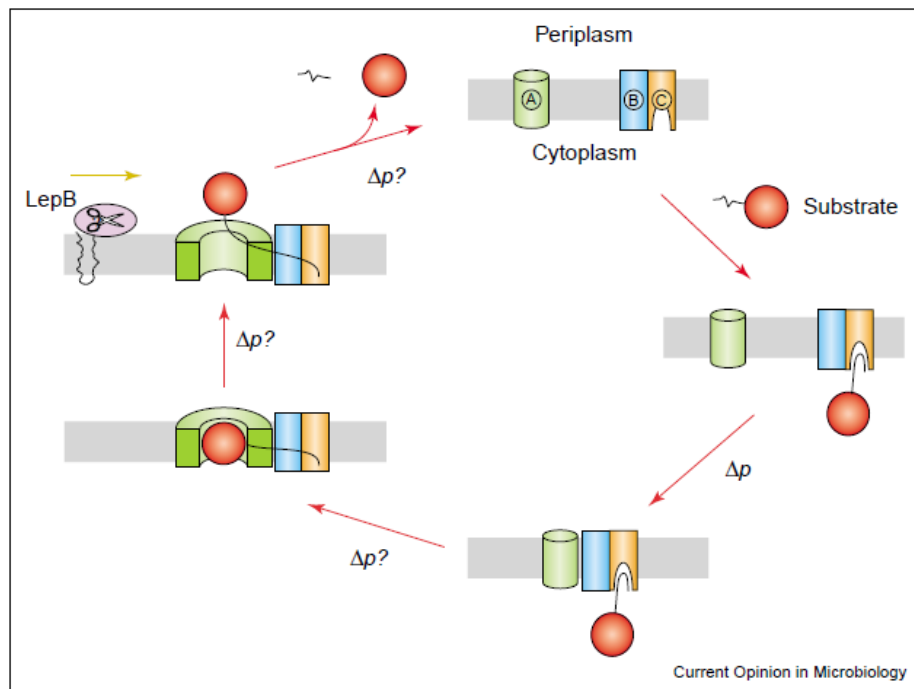


Figure 12: Modèle de translocation d'une protéine via le système Tat. Lorsqu'un substrat doit passer la membrane dans sa forme repliée, il va utiliser le système Tat. Le substrat possède un peptide signal qui va être reconnu par TatC (orange). Le complexe TatBC (bleu et orange) va alors ensuite s'associer à TatA (vert), de manière dépendante de la force proton-motrice (Δp). TatA constitue un canal par lequel va passer le substrat. Notons que l'énergie permettant cette étape n'a pas encore été identifiée. Il pourrait s'agir de la force proton-motrice. Une fois que le substrat a passé la membrane, la peptidase LepB va cliver le peptide signal, libérant alors le substrat dans le périplasme. Les composantes TatA et TatBC se dissocient et le système retourne à son état initial, prêt pour une nouvelle translocation (*Berks et al., 2005*).

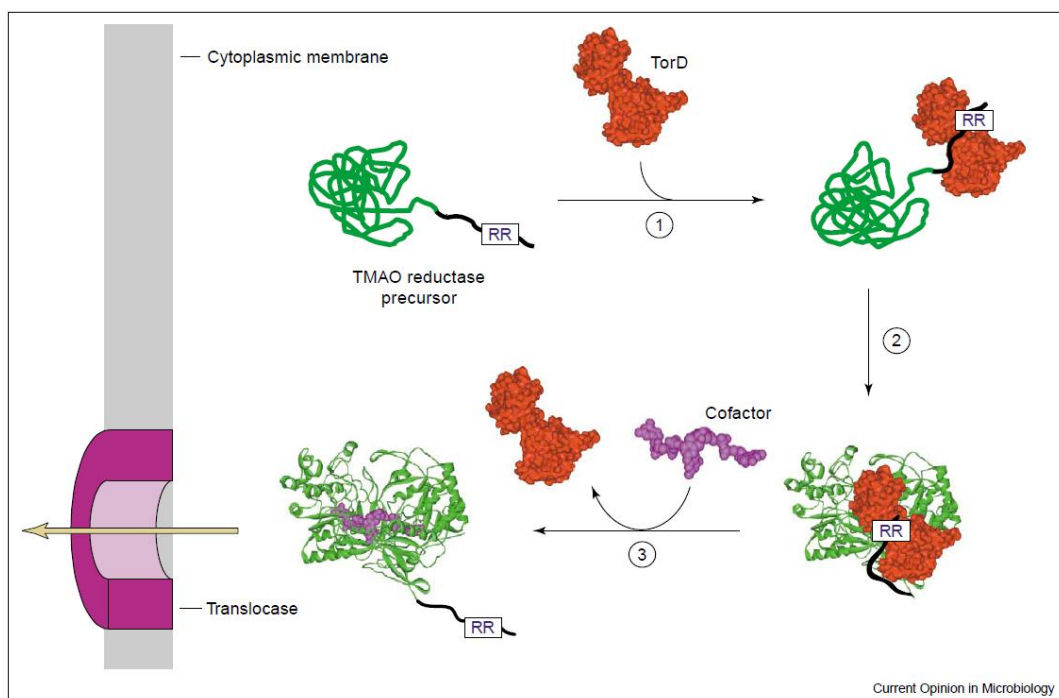


Figure 13: Mécanisme pour empêcher qu'une protéine ne passe la membrane sans son cofacteur. Il existe des protéines chaperonnes, comme par exemple DmsD et TorD, qui vont masquer le peptide signal, empêchant alors la reconnaissance de la protéine par la machinerie de translocation. Ces chaperonnes pourront ensuite se détacher une fois que le cofacteur se sera incorporé à la protéine, libérant alors le signal de la protéine qui pourra être reconnue puis transloquée (*Berks et al., 2005*).

Résultats

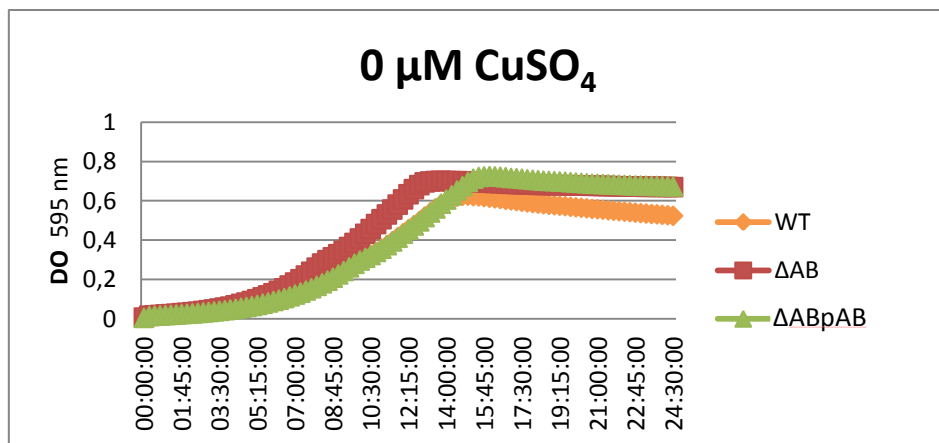


Figure 14: Courbes de croissance durant 24 h des souches WT, ΔAB et ΔABpAB pour une concentration en Cu de 0 μM . Toutes les souches présentent une croissance similaire, avec une phase exponentielle jusqu'à la 14^{ème} heure, suivie d'une phase stationnaire avec une densité optique de ~ 0.8 .

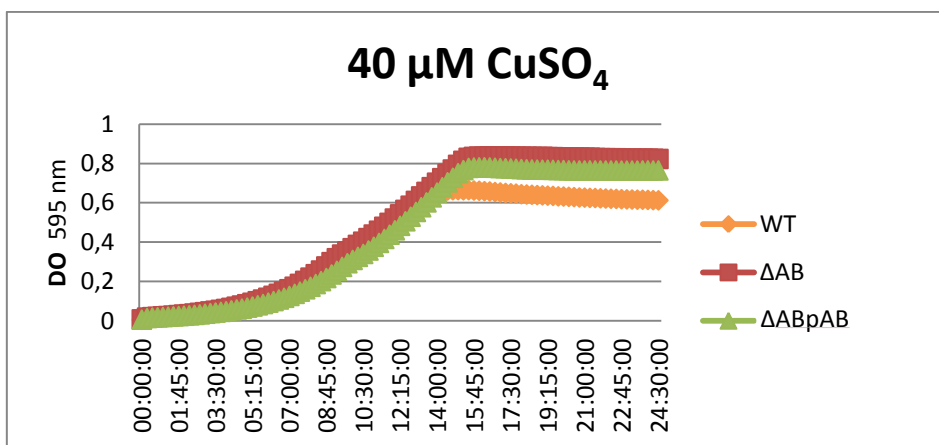


Figure 15: Courbes de croissance durant 24 h des souches WT, ΔAB et ΔABpAB pour une concentration en Cu de 40 μM . Toutes les souches présentent une croissance similaire, avec une phase exponentielle jusqu'à la 14^{ème} heure, suivie d'une phase stationnaire avec une densité optique de ~ 0.8 .

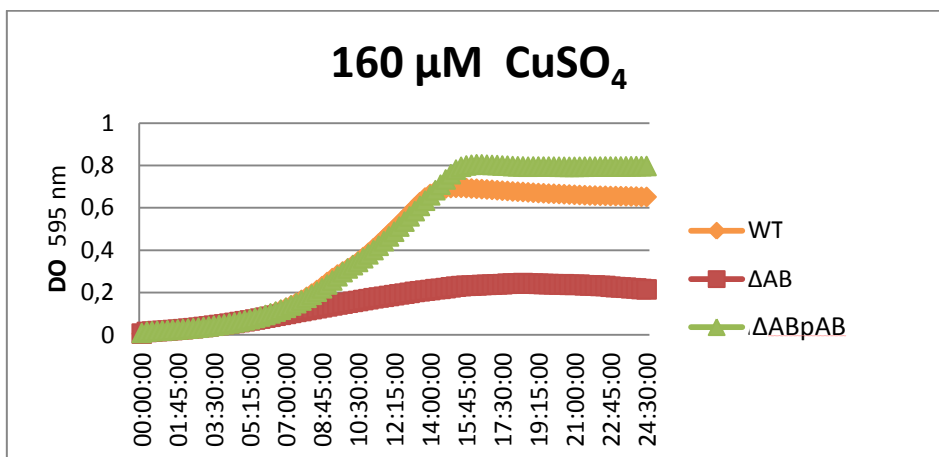


Figure 16 : Courbes de croissance durant 24 h des souches WT, ΔAB et ΔABpAB pour une concentration en Cu de 160 μM . Les souches WT et ΔABpAB ont le même profil que pour les conditions contrôle, sans ajout de cuivre, alors que le double mutant ΔAB est incapable de pousser au-delà d'une absorbance de ~ 0.3 .

Résultats

I. Confirmation des résultats antérieurs

Afin d'étudier l'impact de PcoA et PcoB dans l'homéostasie du Cu chez *C. crescentus*, sa croissance et son phénotype en présence d'un stress en Cu ont été caractérisés.

Des expériences précédemment effectuées par le groupe de recherche sur le double mutant $\Delta pcoA \Delta pcoB$ (appelé ΔAB) ont montré que cette souche était 5 à 6 fois plus sensible à un stress au Cu que la souche sauvage (WT).

La première étape de ce travail de recherche visait à reproduire ces résultats. Pour cela, nous avons mesuré la croissance des souches WT, ΔAB et ΔAB transformée avec un plasmide contenant *pcoA* et *pcoB* (appelée dans ce travail $\Delta ABpAB$) en fonction de différentes concentrations en Cu (0 μM , 40 μM , 160 μM et 1,16 mM de $CuSO_4$). Le taux de croissance de chaque souche a été mesuré avec un lecteur de plaque mesurant la densité optique (595 nm, toutes les 15 minutes à 30 °C avec agitation moyenne) sur une durée de 24 heures.

Le seuil de tolérance au Cu avait préalablement été déterminé à 1,16 mM de $CuSO_4$ pour la souche WT, et à 160 μM pour la souche ΔAB . Au-delà de ces seuils, la croissance des bactéries subissait un impact important du Cu.

Nous avons observé que toutes les souches avaient une croissance similaire dans le milieu minimum défini HIGG sans ajout de Cu, avec une phase exponentielle jusqu'à la 14ème heure, suivie d'une phase stationnaire en plateau à une densité optique de $\sim 0,8$ (Figure 14).

Lors de l'observation de la croissance des différentes souches avec une concentration en $CuSO_4$ de 40 μM , aucune différence significative avec la condition dite « sans Cu » n'a pu être mise en évidence. Toutes les souches croissaient de la même façon, avec une phase exponentielle jusqu'à la 14ème heure, puis une phase stationnaire à une densité optique de $\sim 0,8$ (Figure 15). Ce résultat indique que la concentration de 40 μM de $CuSO_4$ est probablement insuffisante pour induire un stress chez la souche CB15N de *C. crescentus*.

A une concentration de 160 μM en $CuSO_4$. Nous avons observé que le double mutant ΔAB était incapable de pousser au-delà d'une absorbance de 0,3. Cependant, les autres souches (WT et $\Delta ABpAB$) atteignaient leur phase stationnaire à une densité optique de $\sim 0,8$, comme pour la condition contrôle (Figure 16).

La croissance des bactéries en présence d'une concentration en $CuSO_4$ de 1,16 mM semblait impactée pour toutes les souches observées. Le double mutant ΔAB était incapable de pousser (avec une densité optique ne dépassant pas 0,1). Les autres souches atteignaient leur phase stationnaire à une plus faible densité optique ($\sim 0,6$) que dans la condition contrôle (Figure 17).

Ces données confirment les résultats précédemment obtenus dans le laboratoire et suggèrent que PcoA et PcoB sont impliqués dans la résistance au Cu.

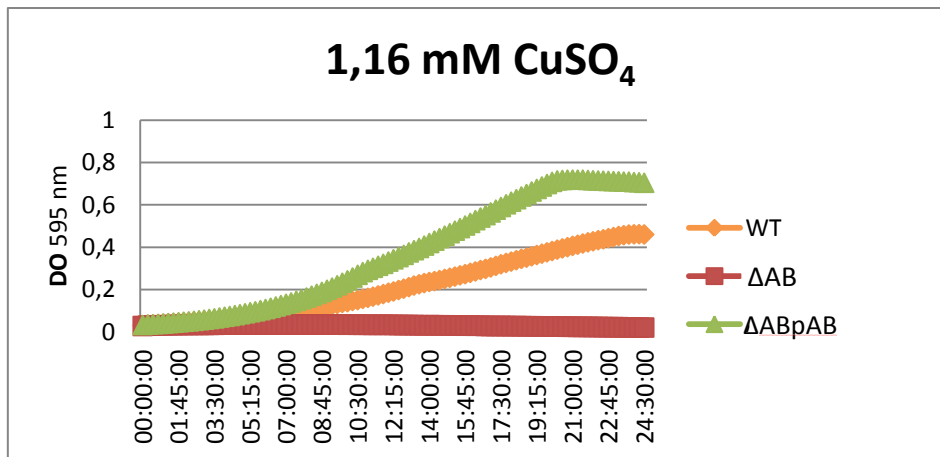


Figure 17: Courbes de croissance durant 24 h des souches WT, ΔAB et $\Delta ABpAB$ pour une concentration en Cu de **1.16 mM**. Les souches WT et $\Delta ABpAB$ ont le même profil que pour les conditions contrôles, sans ajout de cuivre, alors que le double mutant ΔAB est incapable de pousser au-delà d’une absorbance de ~ 0.1 .

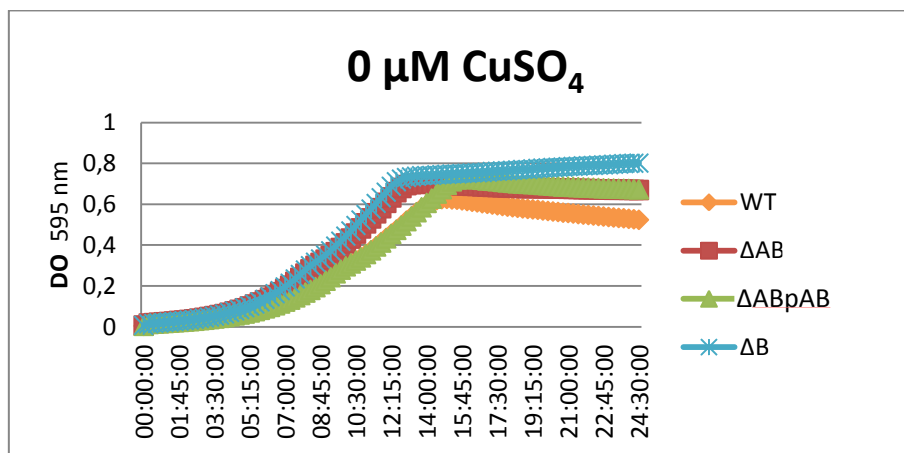


Figure 18: Courbes de croissance durant 24 h des souches WT, ΔAB , $\Delta ABpAB$ et ΔB pour une concentration en Cu de **0 μM**. Toutes les souches présentent une croissance similaire, avec une phase exponentielle jusqu’à la 13^{ème} heure, suivie par une phase stationnaire avec une densité optique de ~ 0.8 .

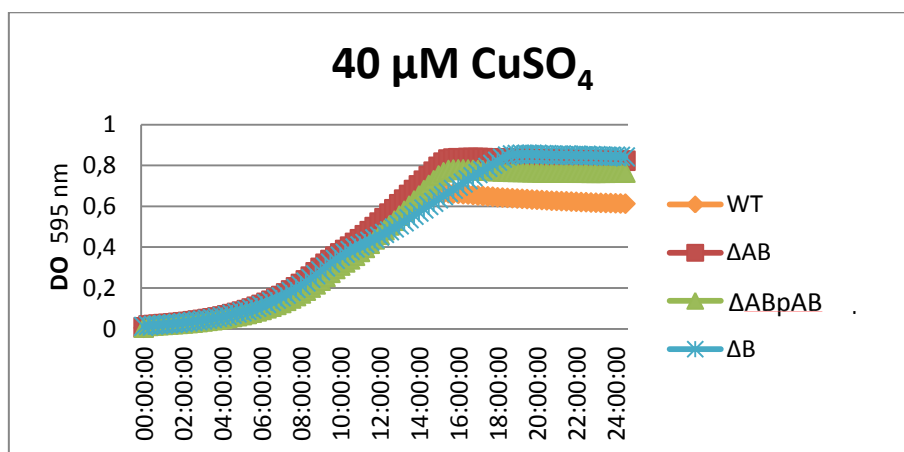


Figure 19: Courbes de croissance durant 24 h des souches WT, ΔAB , $\Delta ABpAB$ et ΔB pour une concentration en Cu de **40 μM**. Toutes les souches présentent une croissance similaire, avec une phase exponentielle jusqu’à la 13^{ème} heure, suivie d’une phase stationnaire avec une densité optique de ~ 0.8 .

II. Caractérisation de PcoA et PcoB

Afin de comprendre la fonction de PcoA et PcoB dans la résistance au Cu, nous les avons étudiés séparément au moyen de plusieurs mutants. Dans un premier temps, nous avons examiné le rôle de PcoB dans l'homéostasie du Cu, en utilisant un mutant KO pour *pcoB* (appelé ΔB , souche déjà construite dans le laboratoire). Nous avons examiné sa croissance à différentes concentrations en CuSO_4 .

Dans le milieu minimum défini HIGG, sans ajout de CuSO_4 , toutes les souches (WT, ΔAB , $\Delta ABpAB$ et ΔB) poussaient de façon similaire, avec une phase exponentielle jusqu'à la 14^{ème} heure, suivie d'une phase stationnaire en plateau à une densité optique de $\sim 0,8$ (Figure 18). Un profil de croissance identique est observé pour une concentration en CuSO_4 de $40 \mu\text{M}$ (Figure 19).

Concernant les concentrations de $160 \mu\text{M}$ et $1,16 \text{ mM}$ de CuSO_4 , nous avons observé que les souches WT et $\Delta ABpAB$ présentaient des courbes de croissance semblables à celles de la condition sans CuSO_4 (Figure 20). Cependant, pour la condition $1,16 \text{ mM}$ de CuSO_4 , la phase stationnaire en plateau est atteinte avec un délai (atteinte aux alentours de la 20^{ème} heure) et une densité optique plus faible ($\sim 0,6$) (Figure 21). Les mutants ΔAB et ΔB étaient, eux, fortement impactés par la concentration en CuSO_4 et étaient incapables de dépasser une densité optique de 0,3 pour la condition $160 \mu\text{M}$ et de 0,1 pour $1,16 \text{ mM}$ (Figure 20) (Figure 21). Ceci suggère que PcoA et PcoB sont essentiels pour la résistance au CuSO_4 , mais cela ne veut pas dire qu'il n'existe pas d'autres systèmes impliqués dans la résistance au Cu.

Après avoir étudié l'effet de PcoA, nous nous sommes intéressés à l'impact de PcoB sur l'homéostasie du Cu en utilisant un mutant KO pour PcoA. Cependant, nous n'avons pas pu obtenir un délétant propre au locus du gène *pcoA* sans impacter la production de PcoB. Il est possible que cela soit dû à un couplage traductionnel entre les gènes *pcoA* et *pcoB*. Ce dernier ne possédant pas de RBS propre, il profiterait de la traduction de *pcoA* pour être traduit à son tour (Figure 22). Nous avons donc voulu utiliser des mutants de *pcoA* ne possédant qu'une délétion partielle du gène, afin de garder un RBS fonctionnel pour la traduction de *pcoB*. L'idée était d'obtenir un mutant qui soit non fonctionnel pour PcoA mais qui n'impacte pas la production de PcoB. Pour cela, nous avons testé 2 mutants de PcoA : le mutant manquant 1200 pb de PcoA ($\Delta A1200$), et le mutant manquant 1500 pb de PcoA ($\Delta A1500$) (souches déjà disponibles dans la banque du laboratoire). Nous avons à nouveau testé la résistance au CuSO_4 au moyen de courbes de croissance.

Nous avons observé que toutes les souches (WT, ΔAB , $\Delta ABpAB$, $\Delta A1200$ et $\Delta A1500$) présentaient le même profil de croissance dans un milieu minimum défini sans ajout de CuSO_4 , avec une phase exponentielle jusqu'à la 15^{ème} heure environ, puis une phase stationnaire en plateau à une densité optique de $\sim 0,8$ (Figure 23). Les bactéries présentaient également des profils similaires pour la concentration de $40 \mu\text{M}$ de CuSO_4 (Figure 24).

Pour les concentrations de $160 \mu\text{M}$ et $1,16 \text{ mM}$ de CuSO_4 , la souche WT ne semblait pas impactée alors que les autres (ΔAB , $\Delta A1200$ et $\Delta A1500$) ne pouvaient pas croître au delà une densité optique de 0,1 (Figure 25) (Figure 26).

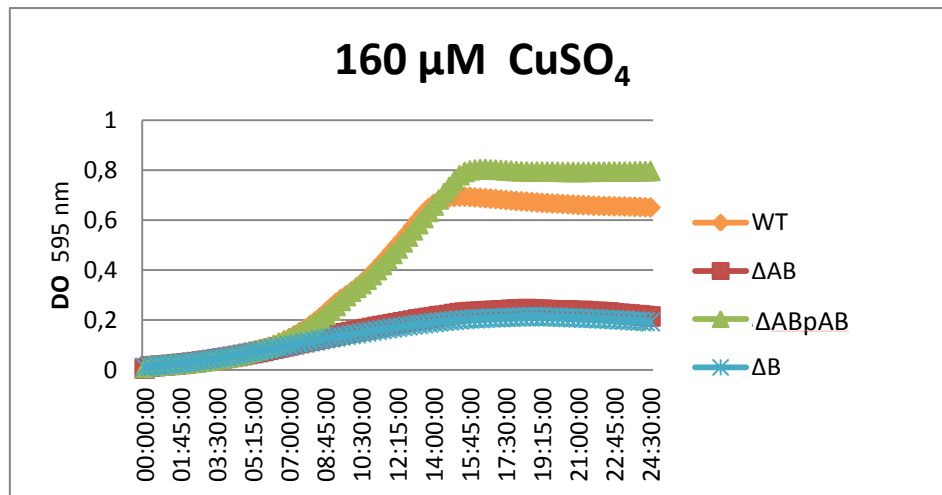


Figure 20 : Courbes de croissance durant 24 h des souches WT, Δ AB, Δ ABpAB et Δ B pour une concentration en Cu de 160 μ M. Les souches WT et Δ ABpAB ont le même profil que pour les conditions contrôles, sans ajout de CuSO_4 , alors que les mutants Δ AB Δ B sont incapables de dépasser une densité optique de 0.3.

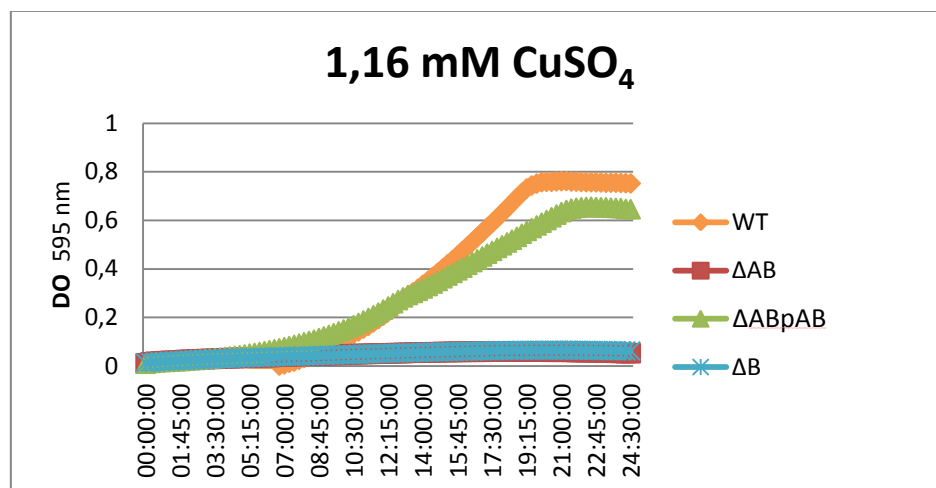


Figure 21: Courbes de croissance durant 24 h des souches WT, Δ AB, Δ ABpAB et Δ B pour une concentration en Cu de 160 μ M. Les souches WT et Δ ABpAB ont le même profil que pour les conditions contrôles, sans ajout de CuSO_4 , avec cependant un retard dans la phase plateau qui atteint une densité optique de 0,6 (un peu plus faible que pour la condition sans Cu) aux alentours de la 20^{ème} heure. Les mutants Δ AB Δ B sont incapables de dépasser une densité optique de 0.1.

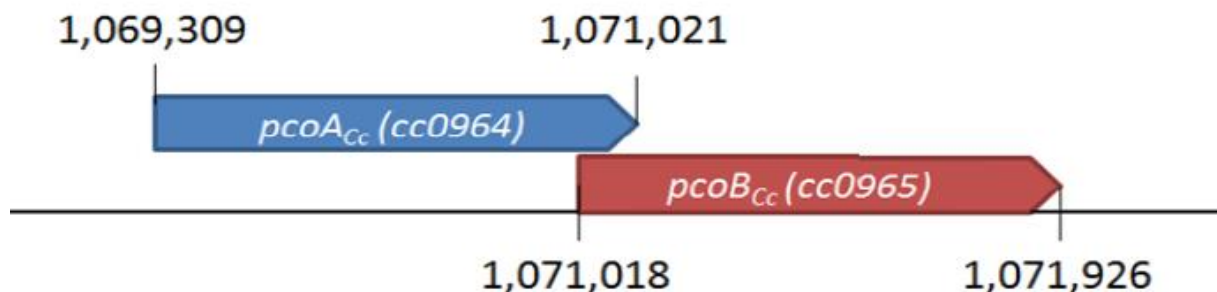


Figure 22: Le système Pco chez *Caulobacter crescentus*. Il est composé des gènes *pcoA* et *pcoB*, avec un chevauchement de 4 nucléotides entre les deux gènes. PcoB ne possède pas de RBS propre, on pense alors qu'il profiterait de la traduction de *pcoA* pour être traduit à son tour.

Prises ensemble, ces données indiquent que les souches $\Delta A1200$ et $\Delta A1500$ sont phénotypiquement similaires à un double mutant ΔAB . En effet, elles sont significativement impactées par le $CuSO_4$ à des concentrations plus faibles que pour la WT. Les résultats suggèrent donc que les souches $\Delta A1200$ et $\Delta A1500$ n'expriment ni PcoA ni PcoB, ce qui appuierait l'hypothèse d'un couplage traductionnel. Afin de confirmer ces données, nous avons testé l'expression de PcoB dans différents fonds génétiques par *western-blot* en utilisant des anticorps polyclonaux anti-PcoB. Nous avons également utilisé des anticorps anti-PcoA pour vérifier la production de PcoA. Des anticorps anti-MreB ont servi de contrôle de charge, pour vérifier qu'une quantité similaire d'échantillons avait été chargée dans chaque puits.

Nous avons observé que les protéines PcoA étaient exprimées dans les souches WT et ΔB . Cependant, nous n'avons pas pu détecter PcoA dans la souche ΔAB (ce qui était attendu), ni chez $\Delta A1200$ et $\Delta A1500$. La longueur de *pcoA* étant de 1700 paires de bases de long, il est probable que retirer 1200 ou 1500 pb ait un impact sur la production de la protéine et sur sa reconnaissance éventuelle par l'anticorps (Figure 27).

Concernant PcoB, il s'exprimait dans la souche WT, mais n'était logiquement pas détecté chez les mutants ΔAB et ΔB . Cependant, il ne semblait pas non plus exprimé chez les mutants $\Delta A1200$ et $\Delta A1500$, ce qui renforce l'hypothèse que la délétion de *pcoA* a un impact sur la production de PcoB (Figure 28).

a) Localisation de PcoA et PcoB

Nous avons également voulu étudier la localisation subcellulaire de PcoA et PcoB, afin de savoir si ces protéines étaient effectivement transportées dans le périplasme comme notre modèle le suggère. Nous avons procédé à un fractionnement cellulaire dans différents fonds génétiques. Ce protocole génère 2 fractions: une contenant le cytoplasme et la membrane interne, l'autre contenant le périplasme et la membrane externe

Afin de s'assurer de la pureté de chaque fraction, plusieurs contrôles étaient nécessaires. Les protéines MreB et DivK ont été choisies comme contrôles cytoplasmiques. La protéine PstS, présente uniquement dans le périplasme, a servi de second contrôle. Ne disposant pas d'anticorps anti-PstS, nous avons utilisé un vecteur intégratif (*pXCHYC-2pJK101*) fourni par le laboratoire de Martin Thanbichler (Schlimpert et al., 2012) encodant la protéine PstS fusionnée en C-terminal à la protéine mCherry. Nous avons conjugué ce plasmide dans chaque souche receveuse d'intérêt (WT, ΔAB , $\Delta A1200$, $\Delta A1500$ et ΔB), afin de pouvoir utiliser les anticorps anti-DsRed pour contrôler la production et la localisation de la protéine PstS-mCherry.

La bonne intégration du vecteur a été vérifiée par microscopie à fluorescence (Figure 29) afin de s'assurer que le produit PstS-mCherry était exprimé et de manière stable dans les différents fonds génétiques. L'expression du gène *pstS-mCherry* sous contrôle d'un promoteur *xyl* a été induite pour le test des candidats avec 0,02 % de xylose durant 2h.

Un signal fluorescent visible en microscopie n'est cependant pas une garantie d'un signal en *western-blot*. Les clones exprimant la fluorescence ont donc été testés dans différentes conditions d'induction au xylose (0 mM, 1,5 mM, 15 mM and 150 mM ainsi que pour différents temps d'induction) et différentes conditions d'exposition (Figure 30). Ces différentes conditions ont été testées par *western blot*. La souche WT sans PstS-mCherry a été employée comme contrôle négatif. Les résultats ont indiqué qu'une concentration au-delà de 1,5 mM de xylose n'améliorait pas les résultats.

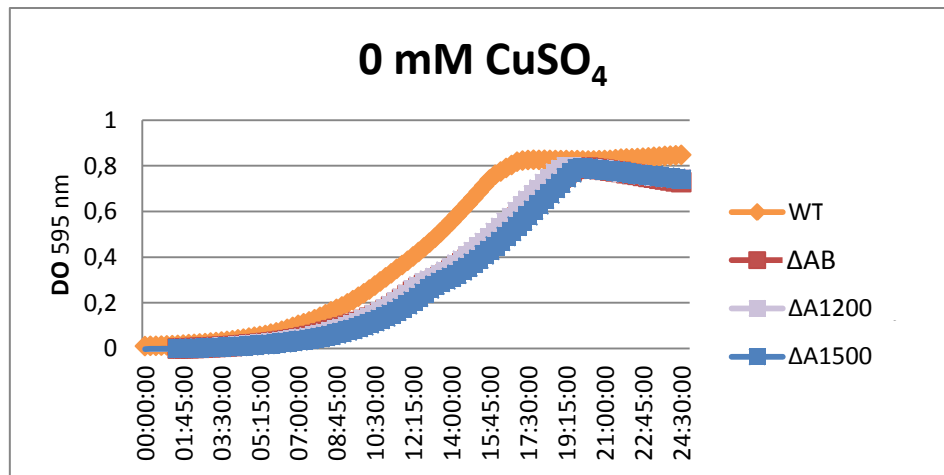


Figure 23: Courbes de croissance durant 24 h des souches WT, ΔAB, ΔA1200 et ΔA1500 pour une concentration en Cu de 0 μM. Toutes les souches présentent une croissance similaire, avec une phase exponentielle jusqu'à la 15^{ème} heure, suivie par une phase stationnaire avec une densité optique de ~0.8.

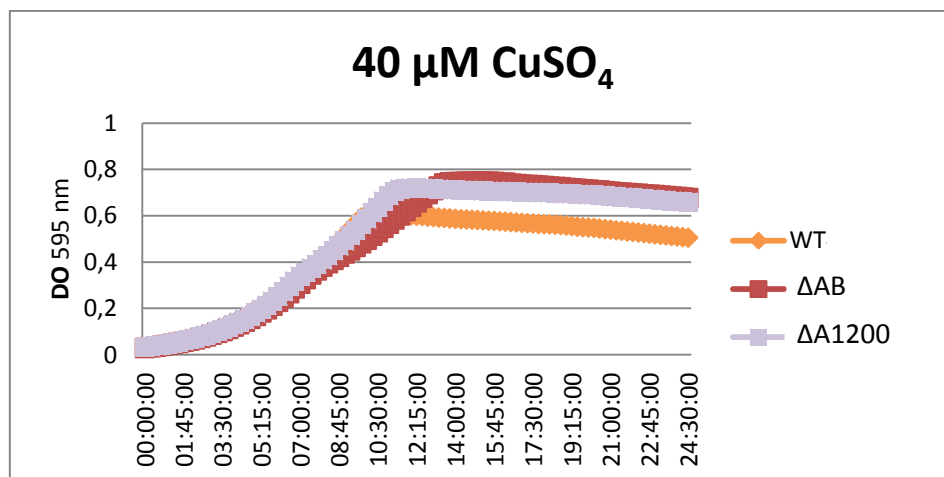


Figure 24: Courbes de croissance durant 24 h des souches WT, ΔAB et ΔA1200 pour une concentration en Cu de 40 μM. Toutes les souches présentent une croissance similaire à la condition contrôle, sans ajout de CuSO₄, avec une phase exponentielle suivie d'une phase stationnaire avec une densité optique de ~0.8.

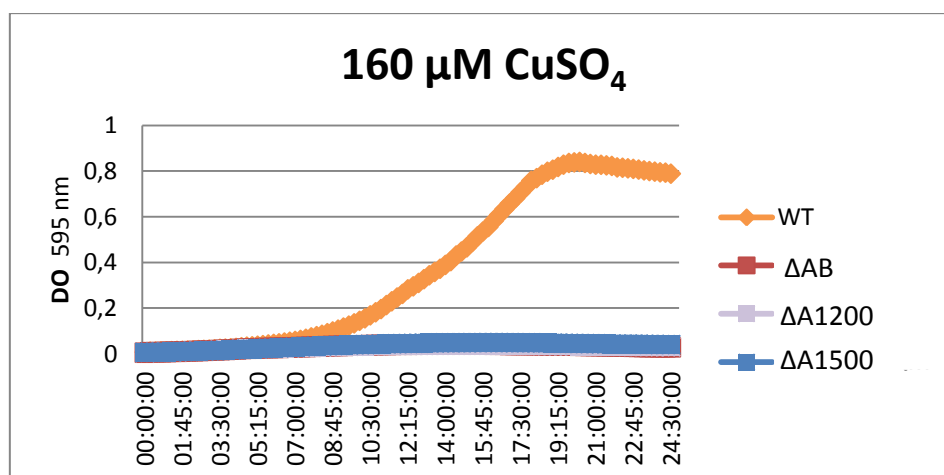


Figure 25: Courbes de croissance durant 24 h des souches WT, ΔAB, ΔA1200 et ΔA1500 pour une concentration en Cu de 160 μM. La souche WT pousse comme dans la condition contrôle, sans ajout de CuSO₄, alors que les mutants ΔA1200, ΔA1500 et ΔAB ne peuvent dépasser une densité optique de ~0.1.

Après avoir défini les meilleures conditions d'induction au xylose, nous avons vérifié l'expression de PstS-mCherry dans d'autres souches (WT, $\Delta A1200$, $\Delta A1500$, ΔAB , $\Delta ABctd$ et ΔB) par *western-blot* (Figure 31).

Le fractionnement membranaire a donc été réalisé sur les souches possédant la fusion PstS-mCherry. Les protocoles de fractionnement testés visaient à générer des sphéroplastes grâce à un choc osmotique précédé d'un traitement au lysozyme pour fragiliser et fractionner les membranes externes.

Nous avons essayé différents protocoles : celui de Khatira Anwari (*Anwari et al., 2010*), utilisant du lysozyme et un choc au sucrose ; celui de Sophie LeBlastier, qui utilise du lysozyme et un choc au PEG ; celui de Schmidt, basé sur du lysozyme et de la pénicilline (*Schmidt & Stanier, 1966*); et celui de Döhmer (*Döhmer et al., 2014*), avec un détergent zwitterionique. Seul le dernier a fourni des résultats probants. Les précédents induisaient trop de contaminations entre les fractions. Les échantillons observés au microscope présentaient un taux trop important de lyse cellulaire totale. Le contenu contaminait dès lors toutes les fractions. Malgré les différentes mises au point (en variant la quantité de lysozyme, le temps de contact et les vitesses de centrifugation), il semblait difficile d'obtenir des échantillons suffisamment purs de manière reproductible. Il a donc fallu trouver un autre protocole qui serait moins dommageable pour les cellules, ce qui est le cas du détergent zwitterionique (Zwittergent).

Tout d'abord, il a fallu mettre au point ce dernier protocole, afin de déterminer les conditions optimales. Nous avons déjà remarqué, lors des mises au point des protocoles précédents, que les cellules qui avaient été mises en culture en HIGG présentaient des membranes plus fragiles que celles en PYE. En effet, nous avons observé par microscopie qu'il y avait plus de cellules lysées lorsqu'elles provenaient de cultures réalisées en HIGG. Nous avons donc voulu confirmer ces observations pour le nouveau protocole. Pour cela, nous avons appliqué le protocole sur les souches WT et WT-PstS-mCherry, en parallèle en PYE et en HIGG. Après plusieurs étapes de traitements, nous avons pu observer deux fractions séparées, une avec le cytoplasme et la membrane interne (culot contenant les sphéroplastes), et l'autre contenant le périplasme et la membrane externe (surnageant). Ces fractions ont alors été caractérisées par *western-blot*, en utilisant différents anticorps dirigés contre nos protéines d'intérêt (anti-DsRed, anti-MreB, anti-PcoA et anti-PcoB). Les échantillons issus de bactéries cultivées en HIGG présentaient une variabilité importante entre les réplicats. Par contre, les échantillons issus de bactéries cultivées en PYE semblaient beaucoup plus reproductibles, ce qui pourrait indiquer que la culture en HIGG rend la membrane trop fragile pour ce type d'expérience.

Nous avons donc analysé par *western-blot* l'expression de PcoA, PcoB, mCherry et MreB dans la souche WT-PstS-mCherry. Le contrôle PstS-mCherry se retrouvait uniquement dans la fraction périplasmique et le contrôle MreB dans la fraction cytoplasmique. PcoA était détecté dans la fraction périplasmique (Figure 32). Ces résultats confirmeraient donc bien notre modèle qui localiserait PcoA dans le périplasme.

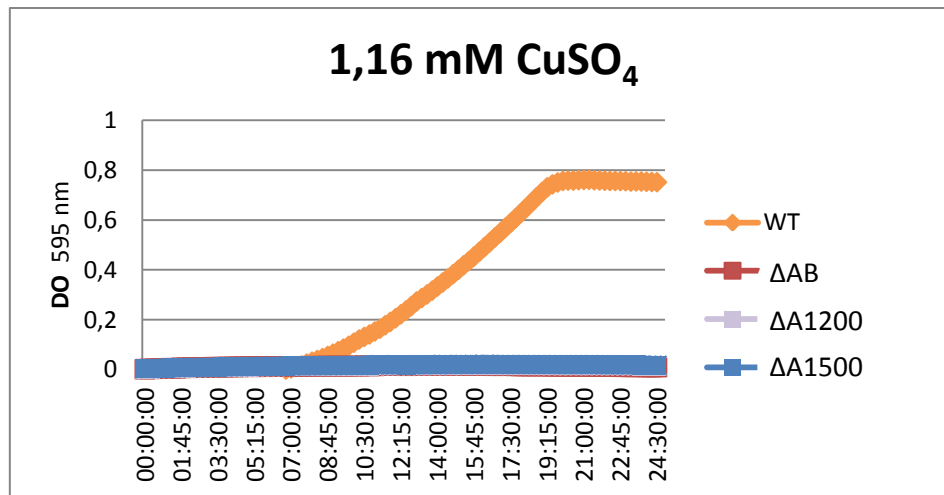


Figure 26: Courbes de croissance durant 24 h des souches WT, ΔAB, ΔA1200 et ΔA1500 pour une concentration en Cu de 1.16 mM. La souche WT présente une croissance similaire à la condition contrôle, sans ajout de CuSO₄, alors que les mutants ΔA1200, ΔA1500 et ΔAB ne peuvent dépasser une densité optique de ~0.1.

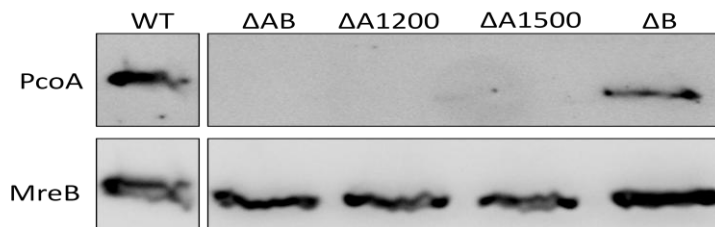


Figure 27: Western blot des extraits protéiques totaux des souches WT, ΔAB, ΔA1200, ΔA1500 et ΔB, en utilisant les anticorps anti-PcoA et anti-MreB. PcoA est exprimé dans les souches WT et ΔB, mais pas dans les souches ΔA1200, ΔA1500 et ΔAB. Ces résultats ne semblent pas être dus à un mauvais chargement car on peut remarquer que le contrôle MreB est présent en quantité égales dans chaque puits.

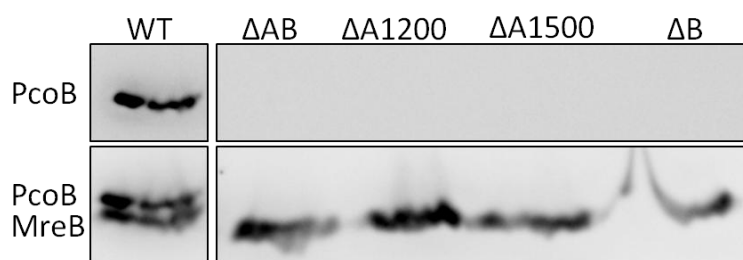


Figure 28: Western blot des extraits protéiques totaux des souches WT, ΔAB, ΔA1200, ΔA1500 et ΔB, en utilisant les anticorps anti-PcoA et anti-MreB. PcoB est exprimé dans la souche WT, mais pas chez les mutants ΔA1200, ΔA1500, ΔAB et ΔB. Ces résultats ne semblent pas être dus à un mauvais chargement car on peut remarquer que le contrôle MreB est présent en quantité égales dans chaque puits.

Afin de confirmer la localisation membranaire de PcoB, nous avons utilisé un protocole qui isole les membranes (*Le Blastier et al., 2010*). Les fractions membranaires obtenues par ultracentrifugation ont alors été observées par *western-blot*. Afin de s'assurer de la pureté des fractions, nous avons utilisé différents contrôles : DivK, comme contrôle cytoplasmique ; CckA, comme contrôle de la membrane interne ; RsaF et Elps-3Flag, comme contrôles de la membrane externe (*Figure 33*). PcoB était essentiellement détecté dans la membrane externe, ce qui confirmerait notre modèle.

PcoA n'a pas été détecté dans les fractions membranaires, ce qui soutiendrait l'hypothèse le situant uniquement dans l'espace périplasmique (*Figure 34*).

b) Relation localisation et fonction : Δ Tat

Nous devons également tester l'hypothèse de notre modèle, selon laquelle PcoA et PcoB se retrouveraient dans le périplasme grâce au système Tat, et que PcoB serait transloqué avec PcoA. Pour cela, nous avons besoin d'un mutant PcoA délété pour le signal Tat (Δ Tat), requis pour la translocation. Nous avons essayé deux approches différentes afin de construire ce mutant : via la recombinaison homologue au locus et via l'introduction dans la souche Δ AB d'un plasmide contenant pcoAB délété pour la séquence Tat.

Pour la première approche, nous avons utilisé des outils bioinformatiques afin d'élaborer des amorces de part et d'autre du signal Tat, dans le but de faire une recombinaison homologue menant à la perte de ce signal (*Table 1*). Nous avons cloné cette séquence dans les plasmides pNPTS et pSK, respectivement low copy et high copy. Des clones ont été obtenus chez *E. coli*, portant le plasmide contenant les séquences amont et aval du signal Tat. Une recombinaison homologue a alors été effectuée, suivie de deux sélections successives (Kan et sucrose) afin de garder les bons clones ayant perdu le signal Tat.

La seconde approche consistait à incorporer dans une souche Δ AB un plasmide low copy contenant une copie en trans de pcoAB délété pour la séquence Tat, sous le contrôle de son propre promoteur natif. Pour ce faire, nous avons essayé 2 méthodes :

La première consistait à amplifier par PCR une séquence correspondant aux 250 premiers nucléotides du gène *pcoA* délété pour son signal Tat. Une deuxième amplification PCR consistait à amplifier la suite du gène *pcoA* ainsi que *pcoB*. Pour finir, une troisième PCR visait alors à combiner les 2 fragments obtenus lors des PCR précédentes (*Figure 35*). Le produit final obtenu était ensuite intégré dans un plasmide low copy pMR20, en vue d'une recombinaison au locus.

La seconde méthode utilisée visait à obtenir un plasmide low copy (PMR20) contenant une version de *pcoAB* délétée pour son signal Tat par triple ligation. Les 3 fragments à liguer étaient obtenus par restriction enzymatique de séquences génétiques provenant de différentes souches, en veillant à ce que les extrémités soient compatibles. Nous avons donc restreint, premièrement, le vecteur cible vide (pMR20), deuxièmement, le produit de la PCR1 obtenu lors de la méthode précédente (contenant le début de *pcoA* délété pour son signal Tat), et troisièmement, la suite du gène *pcoA* et *pcoB*, provenant d'une souche DH10B contenant le plasmide PSK avec *pcoA* et *pcoB*.

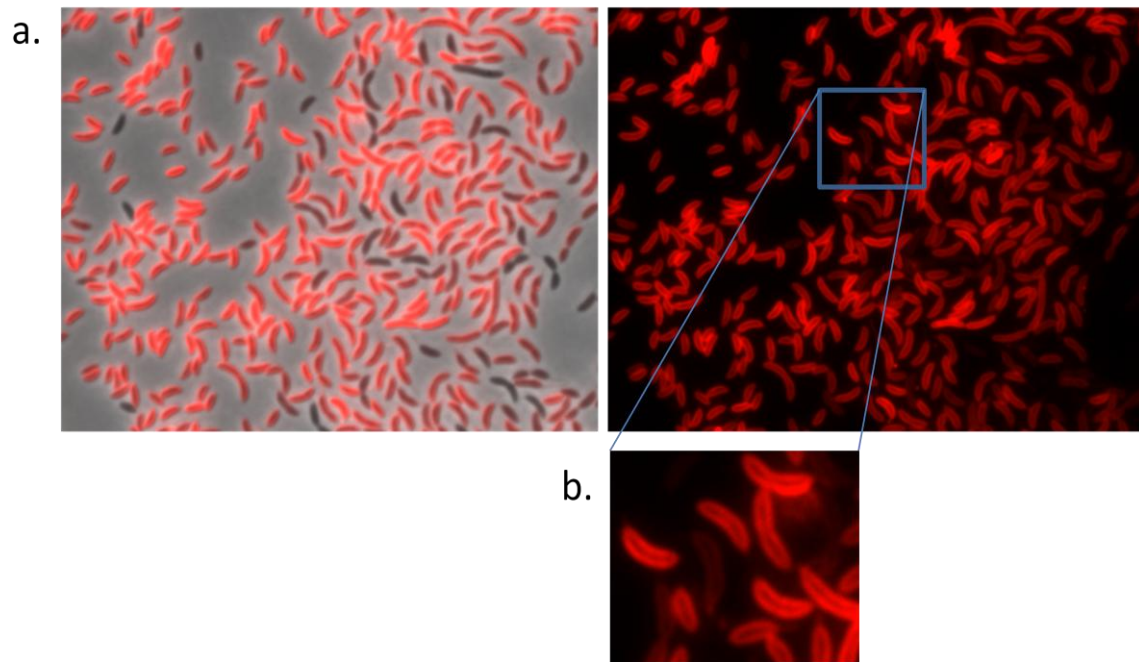


Figure 29: Microscopie à fluorescence de la souche Δ AB-PstS-mCherry. a. Expression du marqueur mCherry lié à la protéine périplasmique PstS après induction au Xylose (1.5 mM durant 2 h). b. Mise en évidence de l'anneau de fluorescence, caractéristique d'un marquage d'une protéine périplasmique (Les autres souches sont en annexe 2).

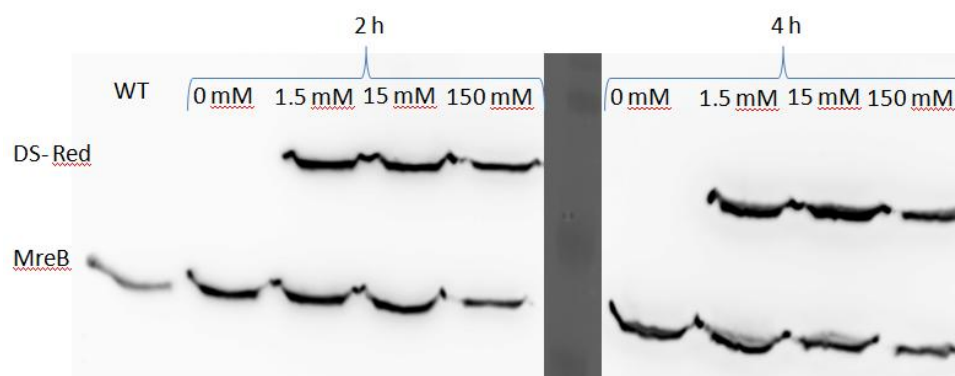


Figure 30: Western blot des extraits protéiques totaux de la souche WT-PstS-mCherry, induite avec différentes concentrations de xylose, en utilisant les anticorps anti-DsRed. Différentes conditions d'induction au xylose ont été testées, afin de déterminer les meilleures conditions d'induction. Les anticorps anti-DsRed ont été utilisés pour détecter la protéine PstS-mCherry. Nous avons déduit qu'une concentration de 1.5 mM de xylose durant 2 h était suffisante pour une induction optimale. Le contrôle MreB est utilisé comme contrôle de charge et semble en quantité similaire dans chaque puits.

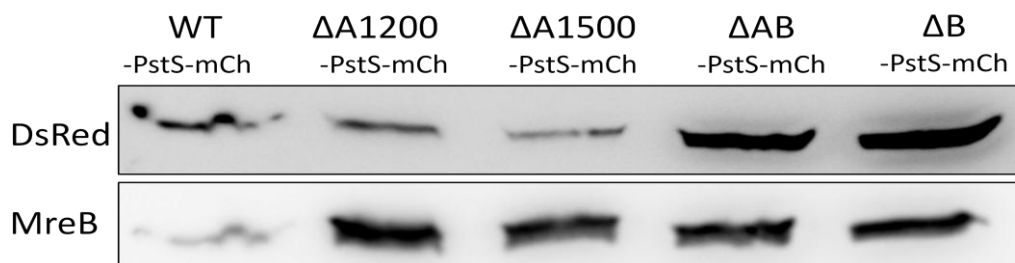


Figure 31: Western blot des extraits protéiques totaux des souches WT-PstS-mCherry, Δ A1200-PstS-mCherry, Δ A1500-PstS-mCherry, Δ AB-PstS-mCherry, Δ ABcted-PstS-mCherry et Δ B-PstS-mCherry, induites au xylose (2 h à 1.5 mM), en utilisant les anticorps anti-DsRed. Le contrôle de charge MreB semble être présent en quantité similaire dans chaque puits.

Ces 2 approches se sont révélées infructueuses. C'est pourquoi une nouvelle méthode est en cours de développement. Cette dernière consiste en une mutagenèse ponctuelle, qui va cibler la seconde arginine (R17) de la séquence consensus du signal Tat, dans le but d'empêcher la reconnaissance du signal Tat par la machinerie de translocation. Concrètement, deux souches seront construites. D'une part, une souche contenant une substitution de 2 nucléotides (CCG en AAG) visant à remplacer l'arginine 17 par une lysine et, d'autre part, une souche contenant une substitution des 3 nucléotides (CCG en GAC) visant à remplacer l'arginine 17 par une aspartate. Cette méthode, contrairement aux autres, permet donc de conserver la majorité de la séquence génétique du signal Tat (même s'il perd sa fonction de signalisation) afin d'éviter une modification de la structure et un mauvais repliement de PcoA. La mutation devra ensuite être introduite dans les différents fonds génétiques de *C. crescentus* (WT, Δ AB, Δ A200, Δ A1200, Δ A1500 et Δ B), qui pourront alors être caractérisés au moyen de courbes de croissance (pour observer leur sensibilité au Cu), et par *western-blot* (pour observer la localisation de PcoA et PcoB).

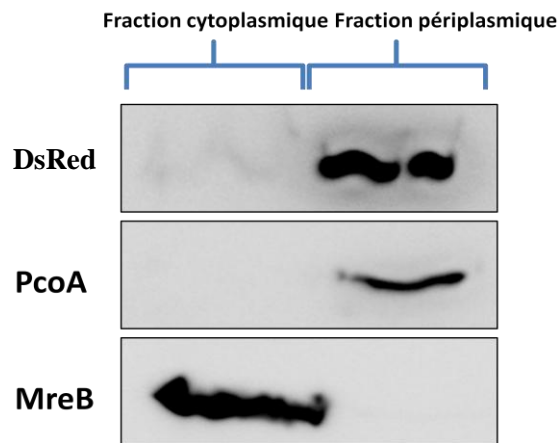


Figure 32: Western blot des fractions cytoplasmiques (contenant le cytoplasme et la membrane interne) et périplasmiques (contenant le périplasme et la membrane externe) de la souche WT-PstS-mCherry, induite à la xylose (2 h à 1.5 mM), en utilisant les anticorps anti-DsRed, anti-PcoA et anti-MreB. Le contrôle PstS-mCherry se retrouve uniquement dans la fraction périplasmique et le contrôle MreB dans la fraction cytoplasmique. PcoA est détecté dans la fraction périplasmique.

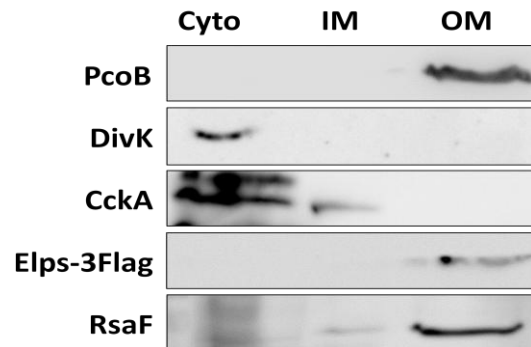


Figure 33 : Western blot des membranes interne et externe de la souche WT-PstS-mCherry. PcoB est détecté dans la membrane externe. Le contrôle DivK est se retrouve dans le cytoplasme, CckA dans la membrane interne, et RsaF et Elps-3Flag dans la membrane externe.

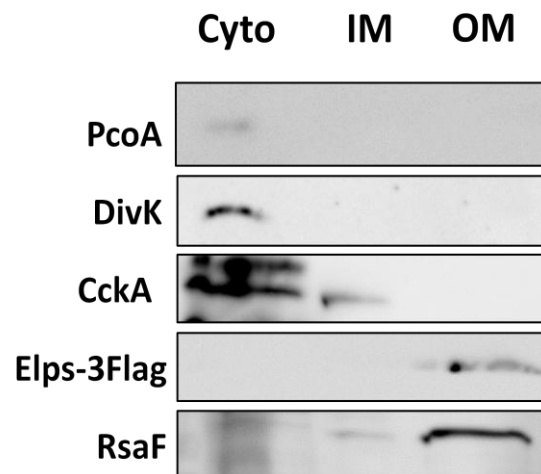


Figure 34 : Western blot des membranes interne et externe de la souche WT-PstS-mCherry. PcoA ne semble pas être détectée dans les fractions membranaires. Le contrôle DivK est se retrouve dans le cytoplasme, CckA dans la membrane interne, et RsaF et Elps-3Flag dans la membrane externe.

Acides aminés	DAERITGYKV GGVSPFGQKK RLPTVLEAAA LAEPYVFLNG GQRGLQVKLA PADAVKALGA VTAAIVAEMV RVLEYGSVMT AFDAGGERSP PALSIEEEKL TVGHTMAKID GKAGHAVTVN GAIPGPLIRL KEGQNVRLSV TNTLDEDTSI HWHGLLVPFQ MDGVPQ
Nucléotides	CGCCGAGC GCATCACCGG CTACAAGGTC GCGGCGTCA GCCCCTTTGG CCAGAAAAAA CGCCTGCCCA CGGTGCTGGA AGCCGCCGCC CTGGCCGAGC CCTATGTGTT CCTCAACGGC GGCCAGCGGG GTTTGCAGGT GAAGCTCGCG CCGGCTGATG CCGTGAAGGC GCTAGGCGCG GTGACGGCGG CGATCGTGCG GGAGtagtg GTTCGGGTGT TGAATATGG ATCGGTGATG ACGGCTTTTG ATGCCGGCGG CGAGCGCTCG CCGCCCGCCT TGTCGGGCGA GGAGATCAAG CTGACGGTCG GCCACACGAT GGCGAAGATC GACGGCAAGG CCGGCCATGC CGTGACCGTC AACGGCGCGA TCCCGGGGCC GCTGATCCGG CTGAAGGAAG GGCAGAACGT CAGGCTGTCG GTGACCAACA CCCTGGACGA GGACACCTCG ATCCACTGGC ATGGCCTTTT GGTGCCGTTC CAGATGGACG GGGTGCCGGG CGTCAGCT
Orange= le gène avant PcoA Vert= le signal Tat Bleu= PcoA	

Table 1: La conception du mutant ΔTat consistait à enlever le signal Tat (en vert dans le tableau). Nous avons localisé ce signal grâce aux outils bioinformatiques, et nous avons élaboré un couple d'amorces de part et d'autre du signal Tat (en orange dans le tableau).

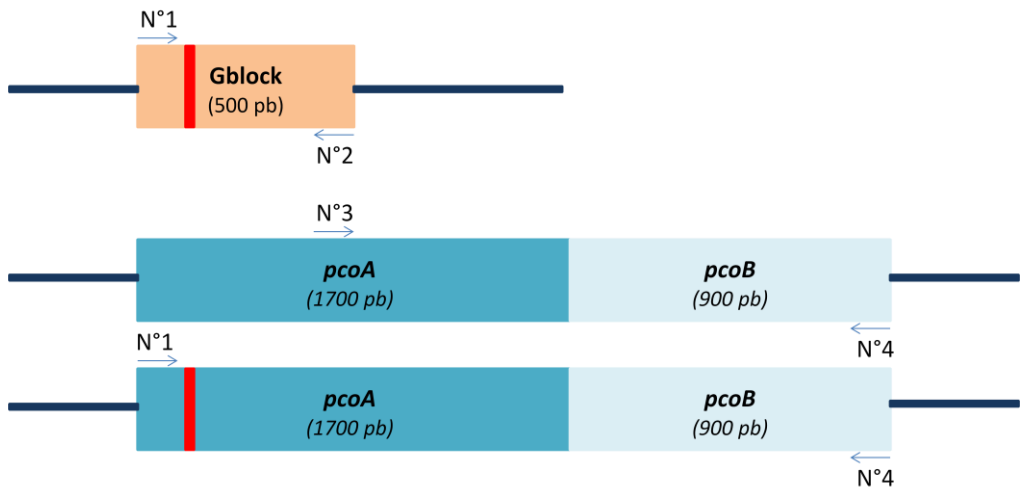


Figure 35: Méthode d'obtention du mutant ΔTat par PCR. Une première PCR amplifie (au moyen des amorces N°1 et N°2) une séquence correspondant aux 250 premiers nucléotides d'un gène *pcoA* délété pour son signal Tat (ligne rouge). Une deuxième PCR consistait à amplifier (au moyen des amorces N°3 et N°4) la suite du gène *pcoA* ainsi que *pcoB*. Une troisième PCR finale visait alors à combiner les 2 fragments obtenus lors des PCR1 et PCR2 (au moyen des amorces N°1 et N°4).

Conclusions et perspectives

Conclusions

Les objectifs de ce mémoire étaient de caractériser les fonctions de PcoA et PcoB chez *C. crescentus* ainsi que leur localisation subcellulaire. Plus précisément, nous voulions savoir si PcoA possède un rôle similaire à CueO, son homologue chez *E. coli*, et s'il est bien transloqué du cytoplasme vers le périplasme via le système Tat. Nous voulions également confirmer les prédictions bioinformatiques qui situent PcoB en membrane externe. De plus, nous voulions savoir comment PcoB se retrouverait en membrane externe. Pour cela, il existe deux hypothèses principales : PcoB pourrait soit emprunter la voie Sec, soit profiter du passage de PcoA par la voie Tat. Par interaction avec PcoA, PcoB pourrait en effet être emporté en même temps dans le périplasme par un système de "hitchhiking".

Ce mémoire a pu apporter quelques éléments de réponse.

I. Confirmation des résultats antérieurs : PcoA et PcoB sont impliqués dans la résistance au Cu chez *C. crescentus*

L'observation de la croissance de la souche sauvage et du double mutant ΔAB de la souche CB15N de *Caulobacter crescentus* en fonction de différentes concentrations en Cu nous a révélé l'importance de PcoA et PcoB dans la résistance au Cu. La souche CB15N sauvage semble impactée à partir d'une concentration en CuSO_4 de 160 μM . En dessous de cette concentration, la bactérie ne semble pas être en condition de stress. Le seuil de tolérance se situe à 1,16 mM de CuSO_4 , à partir duquel la croissance est fortement impactée.

L'observation du double mutant ΔAB a montré une croissance fortement impactée par le Cu à partir d'une concentration en CuSO_4 de 160 μM . Afin de prouver que cette différence de croissance est bien due à l'absence de PcoA et PcoB, nous avons observé la croissance d'une souche ΔAB transformée avec un plasmide contenant une copie des gènes *pcoA* et *pcoB*. Cette souche a montré les mêmes profils de croissance que la souche sauvage, ce qui indique que PcoA et PcoB sont des acteurs importants de la résistance au Cu chez *C. crescentus*.

II. Caractérisation de PcoA et PcoB

a) Fonction de PcoA et PcoB

Les fonctions de PcoA et PcoB ont été étudiées séparément en utilisant différents mutants pour *pcoA* et pour *pcoB*. Nous avons remarqué que les simples mutants pour *pcoA* et *pcoB* ($\Delta A1200$ et $\Delta A1500$ pour *pcoA*, et ΔB pour *pcoB*) avaient un phénotype similaire à celui du double mutant ΔAB . Ces souches étaient impactées pour des concentrations en CuSO_4 plus faibles que la WT. Ceci appuierait l'hypothèse d'un couplage traductionnel entre *pcoA* et *pcoB*. PcoB ne possédant pas de RBS propre, il aurait besoin de la traduction de *pcoA* pour être traduit à son tour. Ainsi, un mutant pour *pcoA* empêcherait la production de PcoB. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons testé l'expression de PcoB dans différentes souches au moyen de *western-blot*. PcoB n'a pas pu être détecté chez les deux mutants de *pcoA* ($\Delta A1200$ et $\Delta A1500$), ce qui semble appuyer notre hypothèse de couplage traductionnel, PcoB ayant besoin de *pcoA* pour être produit.

b) Localisation de PcoA et PcoB

Notre modèle hypothétique prédisait que PcoA se situerait dans le périplasme et que PcoB serait ancré en membrane externe. Afin de prouver ces localisations, nous avons procédé à du fractionnement cellulaire dans différentes souches. Les expériences effectuées ont montré que PcoA et PcoB étaient détectés dans la "fraction périplasmique", qui comprend en fait le contenu de l'espace périplasmique mais aussi la membrane externe. Afin de s'assurer que PcoB se situe bien en membrane externe et non dans l'espace du périplasme, nous avons effectué un fractionnement membranaire par ultracentrifugation afin d'isoler les membranes. La localisation de PcoB en membrane externe a ainsi été constatée, alors que PcoA n'a pu y être détecté.

c) Interaction PcoA et PcoB et transport transmembranaire: Le signal Tat

Les prédictions bioinformatiques soutiennent que seul *pcoA* posséderait un signal Tat, lui permettant de passer du cytoplasme vers le périplasme en traversant la membrane interne par le système Tat. Ce type de signal n'a pas été retrouvé chez *pcoB*. Cependant, celui-ci est prédit pour être ancré en membrane externe, ce qui signifie qu'il doit passer la membrane interne.

Afin de savoir s'il y a un phénomène de cotransport entre PcoA et PcoB pour le passage de la membrane interne, il serait intéressant d'étudier et de caractériser le rôle et la localisation de PcoA et PcoB dans une souche mutée au niveau du signal Tat. Cette souche est actuellement en construction.

Plusieurs situations seraient possibles. Premièrement, même si cela semble improbable au vu du degré de certitude des prédictions bioinformatiques, il se pourrait que notre mutant Tat n'ait aucun impact sur la localisation de PcoA et PcoB. On retrouverait alors PcoA dans le périplasme et PcoB en membrane externe. Ceci signifierait que PcoA utilise probablement un autre système de translocation. Un deuxième constat possible pourrait être que le mutant pour le signal Tat impacte la localisation de PcoA et/ou PcoB. Si PcoA n'est plus détectable dans l'espace périplasmique, comme on pourrait s'y attendre, cela confirmerait que PcoA utilise la voie Tat pour sa translocation. Par ailleurs, si PcoB est toujours détecté en membrane externe dans cette souche, cela signifierait que PcoB n'a pas besoin de PcoA pour passer la membrane, et qu'il utiliserait sans doute un autre système de translocation, comme le système Sec (à moins qu'il ne profite du passage d'une autre protéine que PcoA, via la voie Tat ou non). A l'inverse, si PcoB ne se retrouve pas en membrane externe, cela signifierait probablement qu'il a besoin du passage de PcoA pour traverser la membrane.

Enfin, il serait important de caractériser également la résistance au Cu de ces souches. Par exemple, il serait possible, dans une souche mutée pour le signal Tat de PcoA, de ne retrouver que PcoB dans sa localisation "sauvage" (en membrane externe) alors que PcoA serait séquestrée dans le cytoplasme. Cela ne voudrait pas dire pour autant que PcoB serait fonctionnel. Etudier la résistance au Cu dans une telle souche et y caractériser la fonction de PcoB pourraient apporter d'importants indices sur la relation entre PcoA et PcoB. Ont-ils besoin l'un de l'autre pour fonctionner, ou au contraire, peuvent-ils fonctionner indépendamment ? Des expériences précédemment menées dans le laboratoire, faites dans une souche $\Delta AB + p_{pcoB}$ (mimant un délétant ΔA) semblent montrer que PcoB puisse être au moins fonctionnel sans PcoA, mais ce type d'expérience pourrait confirmer ou au contraire nuancer ces données.

Perspectives :

Il serait nécessaire de poursuivre la construction des souches CB15N::R17K et CB15N::R17D (portant une mutation dans la séquence consensus du signal tat de *pcoA*) et recréer ces mutations dans différents fonds génétiques (WT-*psts*-mCherry, Δ AB-*psts*-mCherry, Δ A1200-*psts* mCherry, Δ A1500-*psts* mCherry, Δ B-*psts* mCherry et Δ AB + *ppcoB*-*psts*-mCherry). Une fois ces souches obtenues, elles pourront être caractérisées quant à leur capacité de croissance en fonction de différentes concentrations en Cu (au moyen de courbes de croissance), et quant à la présence/absence de PcoA et PcoB ainsi que leur localisation (par *western-blot*). Ceci permettra d'avoir quelques éléments de réponse concernant les interactions qu'il y aurait entre PcoA et PcoB, et si PcoB a besoin de PcoA pour passer la membrane interne. Dans la même optique, une co-immunoprécipitation pourrait être conduite, afin de mettre en lumière des interactions entre les protéines PcoA et PcoB.

Une fois PcoA et PcoB caractérisés chez *C. crescentus* du point de vue de leur fonction, localisation et interaction, il pourrait être intéressant d'extrapoler ces résultats à d'autres alpha-protéobactéries, comme *Sinorhizobium meliloti* ou *Brucella melitensis*. Ces 2 bactéries appartiennent à la même famille mais elles présentent des styles de vie très différents. Il est utile de constater que si *pcoA* semble génétiquement bien conservé chez ces bactéries, ce n'est pas le cas du gène *pcoB*. Dès lors, il serait intéressant de regarder si la protéine PcoA chez ces alpha présente la même fonction que chez *C. crescentus*, ou si cela implique des modifications dans la fonction de PcoA, afin de compenser le manque de PcoB par exemple, ou si l'opéron *pcoAB* s'y avère inutile (par redondance ou parce que ces bactéries sont moins sujettes aux stress en Cu de par leur mode de vie).

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

I. Souches

Souches	Caractéristiques
<i>Caulobacter crescentus</i>	Pousse à 30 °C
CB15N	Souche considérée comme sauvage, ne synthétise pas le holdfast. Résistance à l'acide nalidixique.
CB15N ΔA1200	Souche CB15N délétante pour 1200 paires de base de <i>pcoA</i>
CB15N ΔA1500	Souche CB15N délétante pour 1500 paires de base de <i>pcoA</i>
CB15N ΔAB	Souche CB15N délétante pour les gènes <i>pcoA</i> et <i>pcoB</i>
CB15N ΔB	Souche CB15N délétante pour le gène <i>pcoB</i>
CB15N ΔA1200 pMR10 <i>pcoA</i>	Souche CB15N délétante pour 1200 paires de base de <i>pcoA</i> complémentée avec un plasmide contenant <i>pcoA</i>
CB15N ΔA1500 pMR10 <i>pcoA</i>	Souche CB15N délétante pour 1500 paires de base de <i>pcoA</i> complémentée avec un plasmide contenant <i>pcoA</i>
CB15N ΔAB pMR10 <i>pcoA</i><i>pcoB</i>	Souche CB15N délétante pour les gènes <i>pcoA</i> et <i>pcoB</i> complémentée avec un plasmide contenant <i>pcoA</i> <i>pcoB</i>
CB15N PstS-mCherry	Souche CB15N contenant la protéine PstS marquée par un tag mCherry, sous le contrôle d'un promoteur au xylose
CB15N ΔA1200-PstS-mCherry	Souche CB15N délétante pour 1200 paires de base de <i>pcoA</i> , contenant la protéine PstS marquée par un tag mCherry, sous le contrôle d'un promoteur au xylose
CB15N ΔA1500-PstS-mCherry	Souche CB15N délétante pour 1500 paires de bases, de <i>pcoA</i> , contenant la protéine PstS marquée par un tag mCherry, sous le contrôle d'un promoteur au xylose
CB15N ΔAB-PstS-mCherry	Souche CB15N délétante pour les gènes <i>pcoA</i> et <i>pcoB</i> , contenant la protéine PstS marquée par un tag mCherry, sous le contrôle d'un promoteur au xylose
CB15N ΔB-PstS-mCherry	Souche CB15N délétante pour le gène <i>pcoB</i> , contenant la protéine PstS marquée par un tag mCherry, sous le contrôle d'un promoteur au xylose
<i>Escherichia coli</i>	Pousse à 37 °C
DH10B helper	Souche qui aide lors de la conjugaison. Résistance au chloramphénicol
DH10B PSK <i>pcoA</i><i>pcoB</i>	Souche contenant un plasmide PSK comprenant les gènes <i>pcoA</i> et <i>pcoB</i> .

II. Plasmides

Plasmides	Caractéristiques	Résistance
pSK-oriT	Plasmide à haut nombre de copies. Contient le gène <i>lacZ</i> qui permet de faire un test de sélection blanc/bleu. 3000 paires de bases.	Ampicilline
pMR10	Plasmide à faible nombre de copies. 8500 paires de bases.	Kanamycine
pMR20	Plasmide à faible nombre de copies. 3200 paires de bases.	Oxytétracycline
pNPTS	Plasmide à faible nombre de copies, intégratif. 5681 paires de bases.	Kanamycine (+ marqueur de contre sélection : <i>sacB</i>).

III. Milieux et solutions

Milieux	Composition (pour 1 L)
<u>C. crescentus</u>	
PYE (Peptone Yeast Extract) (milieu riche)	10,0 g de yeast extract 1,1 g de pyruvate de sodium 1,0 g de K_2HPO_4 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (15 g d'agar pour milieu solide) Eau bidistillée pour compléter
HIGG (Hutner base-Imidazole-buffered-Glucose-Glutamate) (milieu pauvre)	5 ml d'imidazole (pH 7) 20 ml de Hutner (<i>composition voir plus bas</i>) 15 ml de sucrose 10 % 7,5 ml de glutamate de sodium 20 % 8,9 ml de NH_4Cl 1 M 2 ml de phosphate 0,1 M Eau bidistillée milliQ pour compléter
<u>E. coli</u>	
LB (Luria-Bertani) (milieu riche)	10 g de peptone 5 g de yeast extract 10 g de NaCl (15 g d'agar pour milieu solide) Eau bidistillée milliQ pour compléter

Solutions	Composition (pour 100 ml)
Hutner	1 g d'acide nitrilotriacétique 1,445 g de $MgSO_4$ 333,5 mg de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 74,8 μ de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 0,356 ml de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 mM 5 ml de métaux « 44 » (<i>composition voir plus bas</i>) Eau bidistillée milliQ pour compléter
Métaux 44	250 mg de Disodium EDTA 1095 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 500 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 154 mg de $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 24,8 mg $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 17,7 mg de $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ Eau bidistillée milliQ pour compléter

IV. Techniques

Techniques relatives aux bactéries

a) Courbes de croissance

But: Caractériser la croissance de bactéries en fonction de certaines conditions.

Les souches mises la veille en pré-culture dans du milieu HIGG afin d'atteindre une densité optique (660 nm) de 0,4 pour le lendemain, ce qui correspond à une phase exponentielle. Les souches sont ensuite diluées à une densité optique (660 nm) de 0,01 et placées dans les puits d'une plaque contenant les conditions étudiées. Cette plaque, contenant 96 puits, est alors lue toutes les 15 min par un spectrophotomètre BioTek microplate afin d'évaluer l'évolution des densités optiques (595 nm), et donc la croissance des bactéries, au cours de 24 h ou 48 h. La plaque est mise à 30 °C, sous agitation moyenne constante.

b) Conjugaison (tri parental mating)

But: Transférer du matériel génétique d'une bactérie à une autre.

- Mélanger : 1 ml de *C. crescentus* acceptrices + 50 µl de *E. coli* donneuses + 50 µl de *E. coli* helper
- Centrifuger 3 min à 6000 rpm
- Jeter le surnageant et resuspendre le culot dans 1 ml de PYE
- Centrifuger 3 min à 6000 rpm
- Jeter le surnageant sauf 100 µl, avec lesquels le culot est resuspendu
- Déposer les 100 µl en une goutte sur une boîte de Pétri contenant du PYE sans antibiotiques
- Incuber minimum 4 h à 30 °C
- Étaler la moitié de la goutte sur une autre boîte de Pétri contenant du PYE avec les antibiotiques kanamycine et acide nalidixique
- Incuber 2 jours à 30 °C

c) Test sucrose

But: Sélectionner les clones qui ont intégré la séquence d'intérêt.

Les clones isolés provenant de la conjugaison sont striés sur une boîte de Pétri contenant du PYE-agar avec de la kanamycine. Le lendemain, les colonies sont placées dans un falcon contenant 3 ml de PYE liquide. Lorsque les cultures atteignent une densité optique (660 nm) de 0,4, elles sont diluées (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-5}) puis étalées sur une boîte contenant du PYE-agar avec du sucrose 3%. Ensuite elles sont étalées en parallèle sur des boîtes avec du PYE-agar et kanamycine. Les colonies qui poussent sur sucrose et pas sur kanamycine sont les colonies qui ont intégré la séquence.

d) Transformation en souches compétentes par choc thermique

But: Introduire du matériel génétique dans une bactérie receveuse acceptrice grâce à un choc thermique.

La souche compétente utilisée est la souche *E. coli* DH10B, dont les membranes sont devenues perméables suite à un traitement préalable au CaCl_2 .

- Déposer 100 μl de cette souche sur glace durant 15 min (pour les décongeler)
- Ajouter 10 μl de matériel génétique
- Incuber 30 min sur glace
- Placer les cellules 2 min à 42 °C (choc thermique)
- Ajouter 1 ml de LB
- Incuber les cellules durant 45 min à 37 °C
- Etaler les bactéries sur boîte de Pétri contenant du LB agar avec les antibiotiques appropriées
- Incuber les boîtes de Pétri pendant une nuit à 37 °C

Pour un test blanc/bleu, il faut rajouter de l'IPTG et de l'X-GAL au PYE-agar, avant l'incubation finale à 37 °C. Les colonies transformées apparaissent alors blanches, alors que les non-transformées apparaissent bleues.

e) Microscopie

Le microscope utilisé est un Zeiss Axio Imager Z1 équipé d'un objectif Zeiss 100X/1.3 Oil Ph3.

Le bloc filtre utilisé pour l'observation des souches contenant la PstS-mCherry était le bloc AlexaFluor 488 nm, avec un temps d'exposition de 2000 msec

f) PCR

But: Amplifier de l'ADN.

❖ Go taq

Pour 50 µl (à multiplier par le nombre d'échantillons + 1):

- 33,5 µl / 35 µl d'eau (en fonction de l'ajout ou non de DMSO)
- 2 µl de dNTPs (5 µM)
- 1 µl d'amorce forward (10 µM)
- 1 µl d'amorce reverse (10 µM)
- 10 µl de tampon Go Taq (5X)
- 2,5 µl de DMSO (seulement pour *C. crescentus*)
- 0,25 µl d'enzyme Go Taq
- 1 µl / 1 colonie ADN (provenant de culture liquide ou d'une colonie prise avec un tips)

Programme :

- 4 min à 94 °C = dénaturation des brins
- 30 cycles de :
 - 30 s à 94 °C = dénaturation des brins matrices
 - 45 s à 50 °C (cette température varie en fonction des amorces) = hybridation des amorces au brin codant
 - 30 s / 500 paires de bases à 72 °C = élongation du brin complémentaire
- 10 min à 72 °C = élongation finale

❖ Takara (Cette enzyme est plus fidèle que la Go Taq)

Pour 50 µl (à multiplier par le nombre d'échantillons + 1):

- 18,5 µl d'eau
- 4 µl de dNTPs (2,5 mM)
- 1 µl d'amorce forward (10 µM)
- 1 µl d'amorce reverse (10 µM)
- 25 µl Tampon Takara High GC (2X)
- 0,5 µl d'enzyme Takara
- 1 µl / 1 colonie (provenant de culture liquide ou d'une colonie prise avec un tips)

Protocole : d'abord mettre l'eau avec l'ADN dans des tubes PCR et faire bouillir pendant 10 min, puis seulement rajouter les autres composants.

Programme en 2 étapes:

- 30 cycles de :
 - 10 s à 98 °C = dénaturation des brins matrices
 - 30 s / 500 pb à 68 °C = élongation du brin complémentaire

Programme en 3 étapes:

- 30 cycles de :
 - 10 s à 98 °C = dénaturation des brins matrices
 - 5 s à 60 °C = hybridation des amorces au brin codant
 - 30 s / 500 pb à 72 °C = élongation du brin complémentaire

❖ Phusion (Cette enzyme est plus fidèle que la Go Taq)

Pour 50 µl (à multiplier par le nombre d'échantillons + 1): sur glace

- 30 µl d'eau
- 10 µl de tampon Phusion GC 5X (pour *C. crescentus*) ou tampon Phusion HF pour *E. coli*
- 2 µl de dNTPs (5 mM) (ou 4 µl des dNTPs de Takara)
- 2,5 µl d'amorce forward 10 µM
- 2,5 µl d'amorce reverse 10 µM
- 1,5 µl de DMSO (seulement pour *C. crescentus*)
- 0,5 µl de la Phusion DNA polymérase
- 1 µl / 1 colonie ADN (provenant de culture liquide ou d'une colonie prise avec un tips)

Programme en 5 étapes:

- 25 à 35 cycles de :
 - 30 s à 98 °C = dénaturation des brins
 - 10 s à 98 °C = dénaturation des brins matrices
 - 30 s à 52-66 °C = hybridation des amorces au brin codant
 - 15 s / 500 pb à 72 °C = élongation du brin complémentaire
 - 10 min à 72 °C = élongation finale

Programme en 4 étapes:

- 25 à 35 cycles de :
 - 30 s à 98 °C = dénaturation des brins
 - 10 s à 98 °C = dénaturation des brins matrices
 - 15 s / 500 pb à 72 °C = élongation du brin complémentaire
 - 10 min à 72 °C = élongation finale

❖ Q5 (Cette enzyme est plus fidèle que la Go Taq)

Pour 50 µl (à multiplier par le nombre d'échantillons + 1): sur glace

- 31,5 µl / 21,5 µl d'eau (en fonction de l'ajout ou non d'enhancer)
- 1 µl de dNTPs 10 mM (ou 4 µl des dNTPs de Takara)
- 2,5 µl d'amorce forward 10 µM
- 2,5 µl d'amorce reverse 10 µM
- 10 µl de Q5 High GC Enhancer 5X (optionnel)
- 10 µl de tampon Q5 Reaction Buffer 5 X
- 0,5 µl de High Fidelity DNA Polymerase
- 1 µl / 1 colonie ADN (provenant de culture liquide ou d'une colonie prise avec un tips)

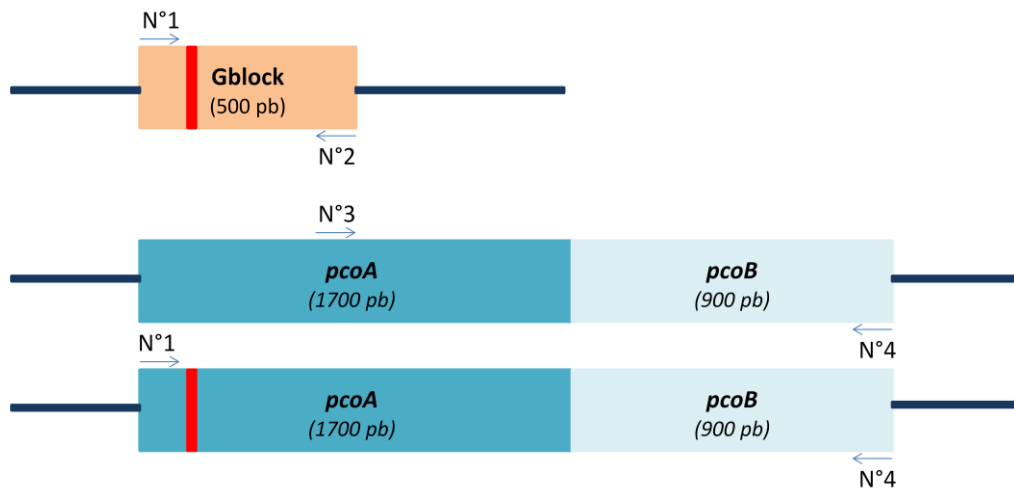
Programme :

- 25 à 35 cycles de :
 - 30 s à 98 °C = dénaturation des brins
 - 5-10 s à 98 °C = dénaturation des brins matrices
 - 10-30 s à 50-72 °C = hybridation des amorces
 - 20-30 s / 1kb à 72 °C = élongation du brin complémentaire
 - 2 min à 72 °C = élongation finale

❖ Liste des amorces utilisées

Amorces	Sens des amorces	Séquence	Commentaires
pGemT-Amont	Forward	GTTTTCCCAGTCACGAC G	Amplification forward des plasmides pGem, PSK et pNPTS.
pGemT-Aval	Reverse	GGAAACAGCTATGACC A	Amplification reverse des plasmides pGem, PSK et pNPTS.
pcoBFNcoI	Forward	CATGCCATGGACGAGC CCGGCGACTGGGCC	Amplification forward de pcoB 900 pb (100pb avant le start du gène afin de prendre le RBS). Site de restriction: NcoI
pcoBRSpel	Reverse	GGAAGTCTACCGCC AGGCGCTGACGC	Amplification reverse de pcoB. Site de restriction: Spel
pPcoAFecoRI	Forward	cggaattcCAGGCGGGCT TGCCGTCCAG	Amplification forward du promoteur endogène de pcoA et pcoB (200pb avant le début de pcoA). Site de restriction: EcoRI
PcoARSacI	Reverse	CGAGCTCTACGCGGC GGCTCCATCGA	Amplification reverse de pcoA. Site de restriction: NcoI
pcoAF	Forward	GTGGTTCGGGTGTTGG AATATGGAT	Amplification forward du gène pcoA (démarré au GTG), sans site de restriction
pcoAR500milieu	Reverse	CAGCCGCACCCGCTCG CCGGGCGCA	Amplification reverse de pcoA (primer s'hybridant en plein milieu (510 pb après GTG) de la séquence de pcoA -> permet le séquençage correcte du gène).
copBREcoRI	Reverse	cggaattccgCTACCGCCA GGCGCTGACGC	Amplification reverse de pcoB. Site de restriction: EcoRI
AvalpcoARHindIII	Reverse	CCCaagcttCCGCCGCT GGGGCGCGGGC	Amplification reverse région aval 500pb de pcoA FORWARD (HindIII) (100pb en aval du start de pcoB situé à 321 bases du start de pcoB prédit ! et 400 pb en aval de ce même start à 321 bases en amont du start de pcoB prédit)
PcoARSacI	Reverse	GAGCTCCGCGGCGGCT CCATCGAGCGGTCGCA C	Amplification reverse de pcoA (sans le TGA)
M13-for	Forward	GCCAGGGTTTTCCAG TCACGA	Amplification forward de PMR20
N°1 : pcoAF-KpnI	Forward	GGTACCGTGGTTCGGG TGTTGGAAT	Amplification forward de pcoA. Site de restriction :KpnI
N°2 :gbl-end reverse	Reverse	TGACGCCCCGGCACCCC GTCCATCTGG	Amplification reverse du Gblock
N°3 :dTatglend-fwd	Forward	CGTTCCAGATGGACGG GGTGCCGGGC	Amorce forward de l'amorce n°2. Amplification forward de PcoA à partir de la fin du Gblock.
N°4 :pcoB-endEcoRI	Reverse	GAATCCCTACCGCCAG GCGCTGACGC	Amplification reverse de PcoB. Site de restriction : EcoRI

❖ Liste des amorces utilisées pour la création de délétants (Δ TAT)



Gblock : Séquence de ~500 paires de bases élaborée afin de contenir le début du gène *pcoA* mais sans le signal Tat.

g) Electrophorèse en gel d'agarose

Les fragments d'ADN de tailles différentes peuvent être visualisés avec une migration électrophorétique en gel d'agarose (1% le plus souvent) contenant du bromure d'éthidium. Celui-ci est un agent intercalant qui va permettre la visualisation de l'ADN sur un banc UV. Les bandes obtenues correspondent aux tailles précises des fragments, qui se séparent avec une vitesse de migration inversement proportionnelle à leur taille (les plus petits migrent plus vite et plus bas). Afin de connaître la taille des fragments, on utilise un marqueur étalon (ladder) avec des bandes de taille connue, que l'on fait migrer en même temps que les échantillons.

Réalisation du gel :

- 1 g d'agarose pour 100 ml de tampon TAE 1X
- Faire chauffer afin de dissoudre l'agarose
- Couler l'agarose liquide dans un support prévu à cet effet
- Ajouter ~5 μ l de bromure d'éthidium et mélanger
- Ajouter des peignes
- Attendre que le gel d'agarose polymérise
- Placer le support contenant le gel solidifié dans une cuve contenant du tampon TAE
- Charger les échantillons + l'étalon
- Faire migrer
- Révéler avec les UVs

h) Purification sur gel

But : Récupérer du matériel génétique dans un gel d'agarose, après migration et séparation de l'ADN en fonction de sa taille. Permet aussi d'inactiver des enzymes de restriction.

Utilisation du kit PCR clean-up, gel extraction de Macherey-Nagel.

- Découper la bande d'ADN correspondante dans le gel d'agarose au moyen d'un scalpel et la déposer dans un eppendorf
- Ajouter 200 µl de NTI par 100 mg de gel
- Mettre 5-10 min à 50 °C pour dissoudre le gel
- Transférer sur un filtre
- Centrifuger 30 s à 11000 g afin de lier l'ADN
- Ajouter 700 µl de NT3
- Centrifuger 30 s à 11000g et vider le surnageant
- Recommencer les 2 étapes de lavage précédentes (recommandé)
- Centrifuger 1 min à 11000 g afin de sécher le filtre
- Transférer le filtre sur un nouvel eppendorf
- Déposer 30 µl d'eau sur le filtre et attendre 1 (à 3) min à température ambiante
- Centrifuger 1 min à 11000 g afin d'éluer l'ADN

i) Extraction d'ADN plasmidique (=minipréparation)

But: Isoler et récupérer des plasmides de bactéries.

Utilisation du kit NucleoSpin Plasmid EasyPure de Macherey-Nagel.

- Centrifuger 1,5 ml de culture bactérienne (lancée la veille en milieu liquide avec antibiotique approprié) 2 min à 13000rpm
- Jeter le surnageant (cette étape peut être répétée plusieurs fois afin d'augmenter la quantité de matériel)
- Resuspendre le culot avec 150 µl de tampon de resuspension A1 + vortexer
- Ajouter 250 µl de tampon de lyse A2 et inverser 5 fois
- Incuber 2 min à température ambiante
- Ajouter 350 µl de tampon de neutralisation A3
- Inverser jusqu'à ce que le lysat change de couleur (passe du bleu au blanc)
- Centrifuger 3 min à 13000 rpm
- Charger le surnageant sur une colonne NucleoSpin Plasmid Easy Pure placée dans un tube collecteur de 2 ml (fourni avec le kit NucleoSpin Plasmid EasyPure de Macherey-Nagel)
- Centrifuger 30 s à 1500 g
- Jeter l'éluat
- Ajouter 450 µl de tampon de lavage AQ sur la colonne
- Centrifuger 1 min à 13000 g (cette étape peut être répétée si la colonne est encore humide)
- Déposer la colonne dans un eppendorf de 1,5 ml
- Ajouter 50 µl d'eau sur la membrane
- Incuber durant 1 min (voire 3 min pour augmenter le rendement) à température ambiante
- Centrifuger 1 min à 13000 g (cette étape peut être répétée pour augmenter la quantité de plasmide récupérée)

j) Restriction enzymatique

But: Cliver l'ADN double brin de façon spécifique, au moyen d'enzymes de restriction. Celles-ci sont des endonucléases, c'est-à-dire qu'elles vont reconnaître des sites particuliers au sein de l'ADN et couper sur les 2 brins (contrairement aux exonucléases qui dégradent à partir des extrémités libres). Ces sites de restriction sont des séquences de quelques nucléotides (4 à 10) qui peuvent être lus le plus souvent dans les 2 sens (=palindromique). Les enzymes peuvent couper de 2 façons différentes : certaines coupent en décalé sur les 2 brins, générant des bouts protrudants, d'autres coupent au même endroit sur les 2 brins, générant des bouts francs.

Pour un volume final de 20 µl :

- 5 à 10 µl d'ADN (en fonction de sa concentration)
- 2 µl de tampon 10 X compatible avec l'enzyme utilisée
- 1 µl d'enzyme de restriction
- Eau pour compléter
- Incuber 1 h (à 3 h) à 37 °C

Note : S'il y a 2 enzymes différentes, il faut mélanger 1 µl de chaque enzyme avec 3 µl de tampon compatible avec les enzymes. Si les 2 enzymes ne sont pas actives dans le même tampon, il faut faire les restrictions séparément.

Les enzymes de restriction et leurs tampons proviennent de Roche Molecular Biochemical.

k) Ligation

But: Insérer du matériel génétique (=insert) dans un plasmide, à un endroit précis de sa séquence.

Pour un volume final de 10 µl :

- 1 µl de plasmide
- 6 µl d'insert
- 2 µl de tampon de ligase
- 1 µl de ligase
- Incuber 1 h à 37 °C ou pendant la nuit à 18 °C.

l) Inactivation d'enzymes

Les enzymes de restriction doivent être inactivées après un certain temps afin d'empêcher/diminuer une activité aspécifique. Cela peut se faire de 2 manières différentes : soit sur colonne (mais cela entraîne des pertes de matériel), soit par chaleur (mais ce n'est pas compatible avec toutes les enzymes, certaines étant résistantes à la chaleur, d'autres pas).

Pour l'inactivation sur colonne :

- 250 µl de tampon de liaison + échantillon PCR
- Transférer le mélange sur un filtre Spin Filter placé dans un eppendorf
- Centrifuger 3 min à 13400 g (=12000 rpm)
- Placer le filtre sur un nouvel eppendorf
- Déposer 10 µl d'eau au centre du filtre
- Incuber 1 min à température ambiante
- Centrifuger 1 min à 1000 rpm afin de récupérer l'ADN

Techniques relatives aux protéines

m) *Western-blot*

Cette technique permet de visualiser des protéines de différents extraits cellulaires en conditions dénaturantes. Les protéines sont d'abord séparées par SDS-PAGE (SodiumD Dodécyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) en gel 12 %. Elles sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose, puis détectées grâce à des anticorps : l'anticorps primaire va se fixer sur sa protéine spécifique, puis un anticorps secondaire anti-anticorps primaires, ira se fixer sur les anticorps primaires. L'anticorps secondaire est couplé à une peroxydase qui permettra la visualisation des protéines après incubation de la membrane dans une solution de révélation ECL. L'immunodétection de la protéine d'intérêt se fait au moyen d'un appareil qui détecte un signal chémoluminescent émis par la réaction qui se passe entre la solution de révélation et la peroxydase.

Les souches sont ensemencées la veille en pré-culture, puis diluées le matin à une densité optique (660 nm) de 0,05, et remises à 30 °C afin d'atteindre la phase exponentielle (D.O de 0,4). Ensuite, 1,5 ml de chaque souche est centrifugé 5 min à 13000 rpm, le surnageant éliminé, et le culot resuspendu avec 100 µl de loading buffer 1X (Pour 25 ml de tampon 2X : 9 ml de SDS 10 %, 4,5 ml de glycérol 100 %, 2,7 ml de Tris HCl 1M pH6,8, 6,3 ml d'H₂O, 0,05 g de bleu de bromophénol et 2,5 ml de β- mercaptoéthanol), avant de les faire bouillir durant 10 min à 99 °C. Les échantillons sont alors prêts pour environ 1 h de migration, 1 de transfert et le marquage avec les anticorps primaires et secondaires, et finalement détection avec l'Image Quant Luminescent Image Analyzer 4000 (GE Healthcare).

n) Sphéroplastes

Plusieurs protocoles différents : celui de Khatira Anwari (sphéroplaste lysozyme + sucrose (*Anwari et al., 2010*)), celui de Sophie LeBlastier (sphéroplaste lysozyme + PEG), celui de Schmidt (sphéroplaste lysozyme + pénicilline (*Schmidt & Stanier, 1966*)), et enfin celui de Döhmer (avec du Zwittergent (*Döhmer et al., 2014*)).

Celui qui a été retenu est celui de Döhmer (*Döhmer et al., 2014*), à base de Zwittergent :

- Centrifuger $2,5 \times 10^{10}$ bactéries (~5 ml de $DO_{600}=1$) (5 min à 5000 rpm)
- Laver avec 1 ml de PBS (x2) (resuspendre complètement et recentrifuger)
- Resuspendre le culot dans 1 ml de Tris-HCl 0,2 M pH=7,6
- Passer dans un Falcon de 15 ml et y ajouter 1 ml de Tris-HCl 0,2 M pH 7,6 + saccharose (sucrose) 1M + Zwittergent 3-16 0,25 %
- Homogénéiser délicatement et incubé 10 minutes à température ambiante
- Séparer en 2 eppendorfs et centrifuger 15 min à 8000 g
- Séparer le culot (=protoplasme) du surnageant (=périplasme)
- Resuspendre le surnageant (périplasme) en Laemmli buffer* : 280 µl de surnageant + 80 µl de Laemmli buffer 5X + 40 µl de DTT 1M
- Resuspendre le culot (protoplasme) dans 70 µl d'eau + 20 µl de Laemmli buffer 5X + 10 µl de DTT 1M
- Pour le western blot, ajouter dans des eppendorfs différents : 10 µl de fraction totale, 4 µl de fraction protoplasmique, et 40 µl de fraction périplasmique.

*Laemmli buffer 5X (20 ml) :

- Mettre 1 ml de 1% de bleu de bromophénol à 4 ml de TrisCl 1,5 M pH 6,8
- Ajouter 10 ml de glycérol et mélanger
- Ajouter 2 g de SDS et mélanger
- Ajouter 5 ml de B-mercaptoéthanol et mélanger
- Conserver à -20 °C

o) Fractionnement membranaire par ultracentrifugation

But : isoler les membranes par ultracentrifugation (*Le Blastier et al., 2010*)

- Lancer les bactéries en culture de 300 ml en PYE
- Lorsque les cellules ont atteint une DO de 0,4, les centrifuger 10 min à 4000 g à 4°C
- Laver 3 fois avec du 50 ml de bicarbonate d'ammonium 50 mM (AMBIC, pH 8,0)
- Resuspendre les cellules dans 5 ml de AMBIC (pH 8,0)
- Faire une sonication des cellules à intensité maximale (20 x 5 s) en gardant sur glace
- Centrifuger 10 min à 12 000 g à 4°C pour éliminer les débris cellulaires (dans le culot)
- Garder le surnageant et le centrifuger 40 min à 100 000 g, 4°C pour obtenir un culot contenant les membranes + garder le surnageant qui contient le cytoplasme
- Resuspendre le culot dans 1 ml de sodium lauryl sarkosinate 1 % et centrifuger 40 min à 100 000g : le surnageant correspond à la membrane interne solubilisée
- Resuspendre le culot dans 1 ml de NaBr 2,5 M et incubé 30 min à 4°C
- Centrifuger 40 min à 100 000g : le culot correspond à la membrane externe
- Resuspendre le culot dans 1 ml de Na_2CO_3 100 mM et centrifuger 40 min à 100 000 g
- Mélanger l'échantillon avec du tampon de chargement SDS-PAGE 2X et préparer pour western-blot

Bibliographie

Bibliographie

- Anwari, K., Poggio, S., Perry, A., Gatsos, X., Ramarathinam, S.H., Williamson, N.A., Noinaj, N., Buchanan, S., Gabriel, K., Purcell, A.W., Jacobs-Wagner, C., Lithgow, T. (2010). A modular BAM complex in the outer membrane of the α -proteobacterium *Caulobacter crescentus*. PLoS One. 5(1): e8619.
- Argüello, J.M., Raimunda, D., Padilla-Benavides, T. (2013). Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. Front Cell Infect Microbiol. 5: 3-73.
- Baize, D. Consulté le 30/11/2015. Les éléments traces métalliques (ETM) dans les sols. Tout ce qu'il faut savoir. Institut national de la recherche agronomique – Science du sol – Orléans.
- Berks, B.C., Palmer, T., Sargent, F. (2005). Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. Curr opinion in microbiology. 8: 174-181.
- Chattopadhyay, M.K. (2006). Mechanism of bacterial adaptation to low temperature. J. Biosci. 31 : 157-165.
- Collège des enseignants de Nutrition. (2011). Les oligo-éléments. Université médicale virtuelle francophone.
- Cotzias, G.C. (1967). Importance of trace substances in experimental health, as exemplified by manganese. Proc First Conf Trace Subst Env Health. Columbia ed. 5-19.
- Curtis, P.D., Brun, Y.V. (2010). Getting in the loop: Regulation of development in *Caulobacter crescentus*. Microbiol Mol Biol Rev. 74:13-41.
- Döhmer, P.H., Valguarnera, E., Czibener, C., Ugalde, J.E. (2014). Identification of a type IV secretion substrate of *Brucella abortus* that participates in the early stages of intracellular survival. Cell. Microbiol. 16(3): 396-410.
- Gordge, M.P., Meyer, D.J., Hothersall, J., Neild, G.H., Payne N.N., Noronha-Dutra, A. (1995). Copper chelation-induced reduction of the biological activity of S-nitrosothiols. Br J Pharmacol. 114(5):1083-1089.
- Grass, G., Rensing, C. (march 2001). Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. J bacteriol. 183(6): 2145-2147.
- Grass, G., Rensing, C. (july 2001). CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. Biochem biophys Res Commun. 286: 902-908.
- Grass, G., Rensing, C., Solioz, M. (2011). Metallic copper as an antimicrobial surface. Appl and environ microbiol. 77 (5): 1541-1547
- Kirkpatrick, C.L., Viollier, P.H. (2012). Decoding *Caulobacter* development. FEMS Microbiol Rev 36: 193-205.

- Le Blastier, S., Hamels, A., Cabeen, M., Schille, L., Tilquin, F., Dieu, M., Raes, M., Matroule, J.-Y. (2010). Phosphate starvation triggers production and secretion of an extracellular lipoprotein in *Caulobacter crescentus*. *PLoS One*. 5(12): e14198.
- Lee, S.M., Grass, G., Rensing, C., Barrett, S.R., Yates C.J.D., Stoyanov, J.V., Brown, N.L. (2002). The Pco proteins are involved in periplasmic copper handling in *Escherichia coli*. *Biochem biophys Res Commun*. 295: 616-620.
- Lee, P.A., Tullman-Ercek, D., Georgiou, G. (2006). The bacterial Twin-Arginine Translocation pathway. *Annu Rev Microbiol*. 60: 373-395.
- Munson, G.P., Lam, D.L., Outten, F.W., O'Halloran, T.V. (2000). Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*. 182(20):5864-5871.
- Osman, D., Cavet, J.S. (2008). Copper homeostasis in bacteria. *Adv appl microbiol*. 65: 217-247.
- Outten, F.W., Outten, C.E., O'Halloran, T.V. (2000). Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, cueR. *J Biol Chem*. 275(40):31024-31029.
- Pereira, B. (2007). La contamination diffuse des sols par les éléments traces métalliques en région wallonne. Faculté d'ingénierie agronomique, biologique et environnementale – UCL.
- Phadtare, S. (2004). Recent developments in bacterial cold-shock response. *Curr. Issues Mol. Biol*. 6: 125-136.
- Poindexter, J.S. (1981). The caulobacters: ubiquitous unusual bacteria. *Microbiol Rev*. 45(1):123-179.
- Rensing, C., Fan, B., Sharma, R., Mitra, B., Rosen, B.P. (2000). CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97(2):652-656.
- Rensing, C., Grass, G. (2003). *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev*. 27: 197-213.
- Samanovic, M.I., Ding, C., Thiele, D.J., Darwin, K.H. (2012). Copper in microbial pathogenesis: meddling with the metal. *Cell Host & Microbe*. 11: 106-115.
- Schlimpert, S., Klein, E.A., Briegel, A., Hughes, V., Kahnt, J., Bolte, K., Maier, U.G., Brun, Y.V., Jensen, G.J., Gitai, Z., Thanbichler, M. (2012). General protein diffusion barriers create compartments within bacterial cells. *Cell*. 151 (6): 1270-1282.
- Schmidt, J.M., Stanier, R.Y. (1966). The development of cellular stalks in bacteria. *J. Cell Biol*. 28(3): 423-436.

- Singh, R.J., Hogg, N., Joseph, J., Kalyanaraman, B. (1996). Mechanism of nitric oxide release from S-Nitrosothiols. *J Biol Chem.* 271(31):18596-18603.
- Stoyanov, J.V., Hobman, J.L., Brown, N.L. (2001). CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Mol Mic Microbiol.* 39(2):502-511.
- Trevors, J.T., Cotter, C.M. (1990). Copper toxicity and uptake in microorganisms. *J ind Microbiol.* 6: 77-84.
- Tsokos, C.G., Perchuk, B.S., Laub, M.T. (2011). A dynamic complex of signaling proteins uses polar localization to regulate cell-fate asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Dev Cell.* 20(3):329-341.
- Tsokos, C.G., Laub, M.T. (2012). Polarity and cell fate asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Curr Opin Microbiol.* 15(6): 744-750.
- Waldron, K.J., Robinson, N.J. (2009). How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat rev Microbiol.* 6: 25-35.

Annexes

Annexes

I. Annexe 1 : Le cycle cellulaire de *Caulobacter crescentus* et sa régulation

Le cycle cellulaire de *C. crescentus* commence avec une cellule sessile pédonculée (stalked cell), considérée comme la cellule mère, qui va entrer en phase S, durant laquelle son ADN va se répliquer et la cellule va s'allonger, devenant alors une cellule prédivisionnelle. Un flagelle va être synthétisé au pôle opposé au pédoncule, générant ainsi, après division et formation de 2 pili de part et d'autre du flagelle, la cellule fille nageuse (swarmer cell). Et le cycle peut recommencer : la cellule mère sessile peut reformer une cellule prédivisionnelle et générer une nouvelle cellule nageuse. Cette dernière, cependant, ne peut répliquer son ADN. Elle est en effet bloquée en phase G1 et ne peut donc pas se diviser. Néanmoins, elle peut se différencier en cellule sessile en produisant un pédoncule muni d'un holdfast et en éjectant son flagelle et ses pili. Ainsi, elle peut à son tour entrer dans le cycle et devenir une cellule prédivisionnelle qui donnera naissance à une cellule nageuse. Notons par ailleurs qu'il ne s'agit pas d'un cycle à proprement parler car la cellule nageuse ne peut se diviser. Il n'y a donc que la cellule sessile qui possède une phase cyclique car elle revient à son état initial et peut recommencer les étapes de division (Curtis & Brun, 2010) (Tsokos & Laub, 2012) (Kirkpatrick & Viollier, 2012).

L'acteur principal qui va gouverner la réplication asymétrique de la bactérie est CtrA. Ce facteur de transcription va, lorsqu'il est activé par phosphorylation, se fixer sur l'origine de réplication pour l'inhiber, empêchant ainsi la réplication de l'ADN. Il permet également l'expression d'une centaine de gènes impliqués dans la morphogénèse polaire et la division cellulaire. CtrA est présent chez les 2 morphotypes cellulaires mais son état de phosphorylation (et donc son activité) varie pour permettre ou non la division. Ainsi, il est abondamment présent sous sa forme active phosphorylée chez la cellule nageuse qui est bloquée en phase G1 et ne peut se diviser. A l'inverse, il est déphosphorylé et dégradé chez la cellule sessile, permettant alors l'entrée en phase S et donc la division. CtrA sera de nouveau produit et phosphorylé après la réplication, permettant alors l'activation de gènes cibles chez les prédivisionnelles (Tsokos & Laub, 2012) (Kirkpatrick & Viollier, 2012).

CtrA est régulé par phosphorylation par CckA, une histidine kinase essentielle. Lorsque CckA est activée/phosphorylée, elle va transférer son groupe phosphore à ChpT, une histidine phosphotransférase. Celle-ci va participer à la stabilisation de CtrA via la phosphorylation de 2 substrats : CtrA (dont la liaison à l'ADN va être renforcée, ce qui va permettre l'expression de plusieurs gènes ainsi que l'inhibition de la réplication) et CpdR (qui est inactif lorsqu'il est phosphorylé et qui ne peut donc plus recruter la protéase ClpXP, empêchant ainsi la dégradation de CtrA). A l'inverse, lorsque CckA est déphosphorylée, elle va agir comme phosphatase et va déphosphoryler CtrA qui devient inactive (Tsokos & Laub, 2012) (Kirkpatrick & Viollier, 2012).

CckA est quant à elle phosphorylée et activée par l'histidine kinase DivL, elle-même sous le contrôle de DivK. Lorsqu'il est phosphorylé, DivK inhibe DivL qui ne peut plus activer CckA. CtrA n'étant pas activé, la réplication peut avoir lieu et la cellule se divise. La phosphorylation de DivK dépend de la kinase DivJ et la phosphatase PleC (Tsokos & Laub, 2012) (Kirkpatrick & Viollier, 2012).

La présence et activation de chacun de ces acteurs dépend du type cellulaire. Ainsi, chez les cellules nageuses (qui ne peuvent se diviser car bloquées en phase G1), PleC déphosphoryle DivK qui ne peut donc plus inhiber DivL, ce qui permet à CckA de rester active et de phosphoryler CtrA, qui va bloquer la réplication. Contrairement aux cellules sessiles chez qui PleC est remplacée par DivJ qui va phosphoryler DivK qui va à son tour inhiber DivL qui ne pourra plus activer CckA, menant à la déphosphorylation et dégradation de CtrA qui ne pourra plus inhiber la réplication, permettant à la cellule de se diviser (Tsokos & Laub, 2012) (Kirkpatrick & Viollier, 2012).

Concernant les cellules prédivisionnelles (qui possèdent un pôle sessile et un pôle flagellé), c'est la localisation de chacun de ces acteurs qui va déterminer leur activité et le potentiel de réplication. En effet, PleC est situé au pôle flagellé, ce qui va entraîner l'activation de CtrA, inhibant la réplication. C'est l'inverse pour le pôle pédonculé où va se retrouver DivJ, ce qui va entraîner l'inhibition de CtrA, permettant la réplication. La localisation de DivJ et PleC aux pôles opposés dépend de facteurs supplémentaires (que je ne peux que citer): SpmX va amener DivJ au pôle pédonculé alors que PodJ va conduire PleC au pôle Flagellé (Tsokos & Laub, 2012) (Kirkpatrick & Viollier, 2012).

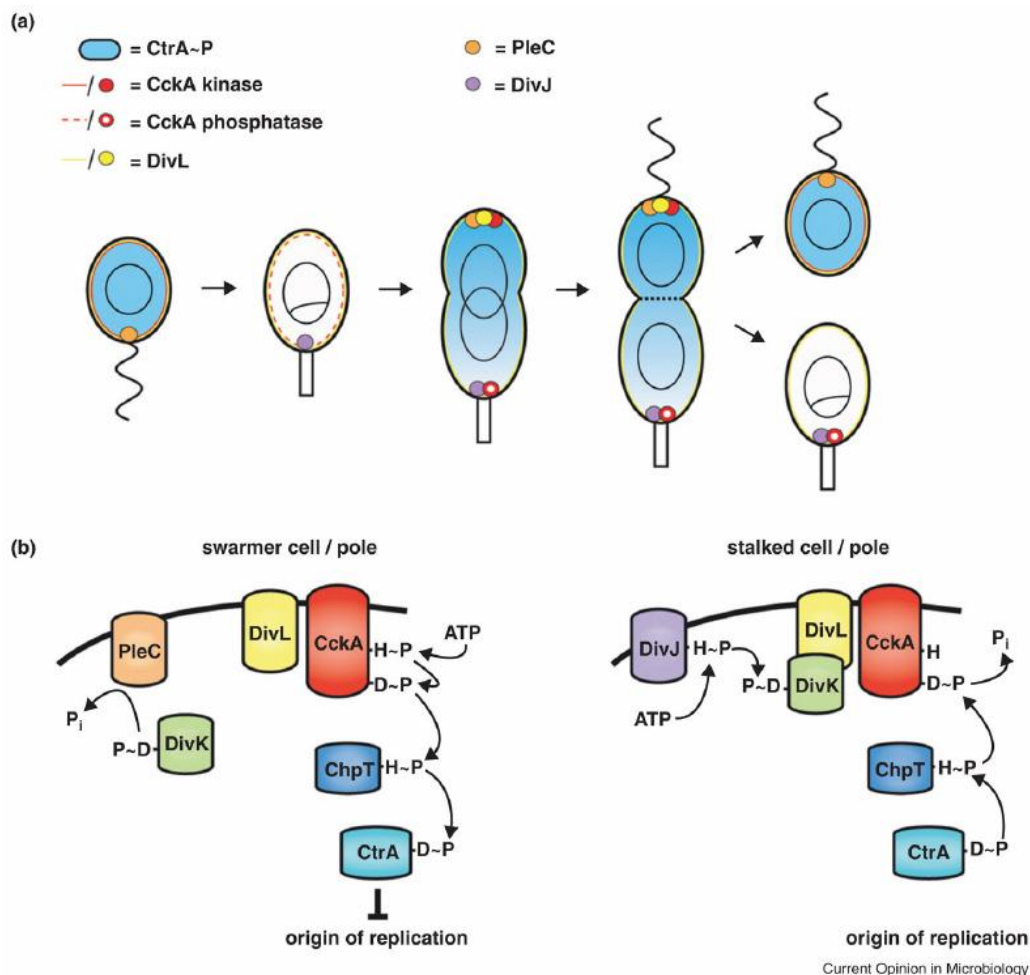


Figure 36 : Régulation de CtrA lors de la division asymétrique de *Caulobacter*. **a.** Répartition subcellulaire des différents acteurs impliqués dans la régulation de CtrA. **b.** Régulation de l'activité de CtrA en fonction du type cellulaire. Dans une cellule nageuse flagellée, la réplication est inhibée par CtrA qui est activée par phosphorylation par CckA via ChpT. La phosphorylation, et donc l'activation, de CckA dépend de la kinase DivL, qui est elle-même inhibée par DivK. DivK est activé par la kinase DivJ, et inactivé par la phosphatase PleC. C'est l'inverse dans une cellule pédonculée, où la réplication peut avoir lieu car CtrA est inhibé par CckA qui peut avoir une activité phosphatase lorsqu'elle n'est pas activée par DivL qui est inhibée par DivK, elle-même activée par DivJ (Tsokos & Laub, 2012, in Tsokos et al., 2011).

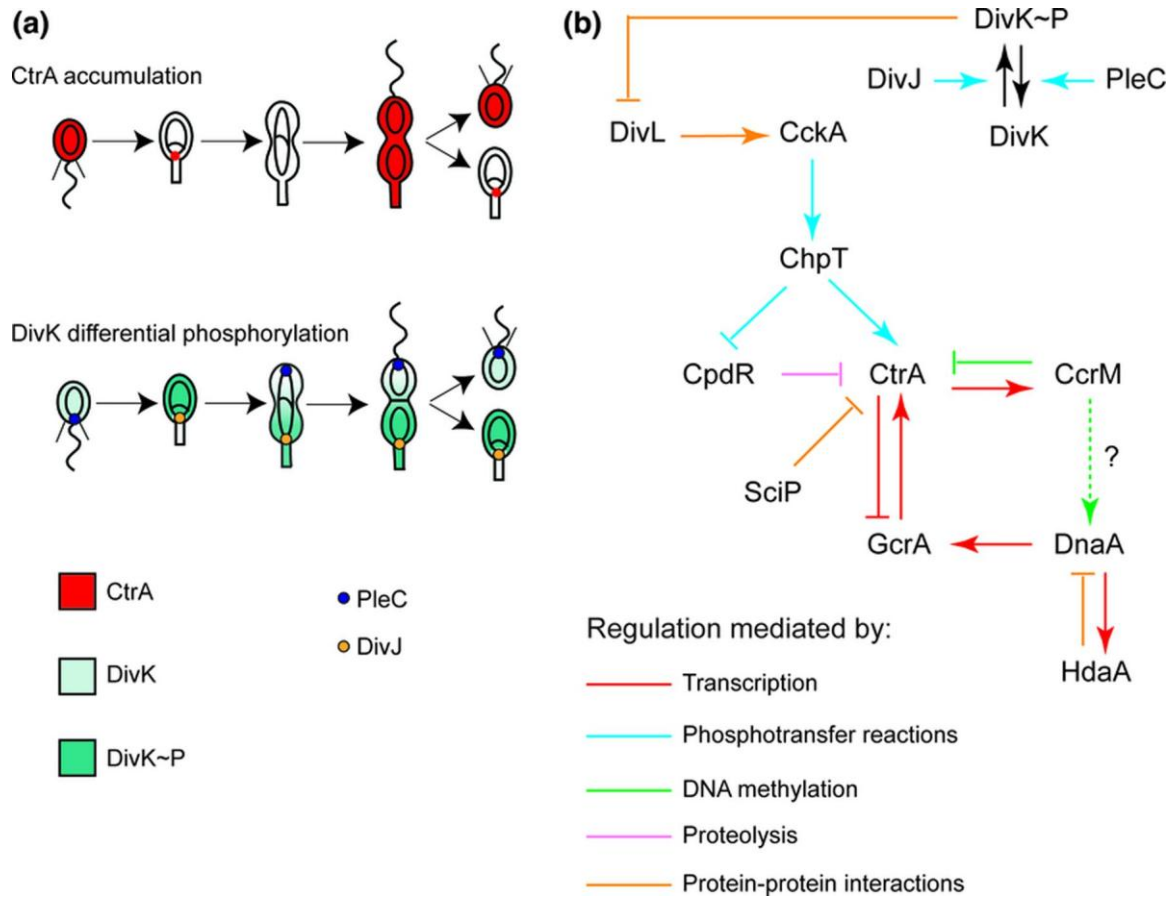


Figure 37: Régulation du cycle cellulaire lors de la division asymétrique de *C. crescentus*. a. Localisation subcellulaire de CtrA, régulateur principal du cycle cellulaire, et état de phosphorylation de DivK au cours du cycle cellulaire. b. Modèle de régulation des différents acteurs du cycle cellulaire (*Kirkpatrick & Viollier, 2012*).

II. Annexe 2 : Microscopie à fluorescence des souches WT-PstS-mCherry, Δ A1500-PstS-mCherry, Δ A1200-PstS-mCherry et Δ B-PstS-mCherry

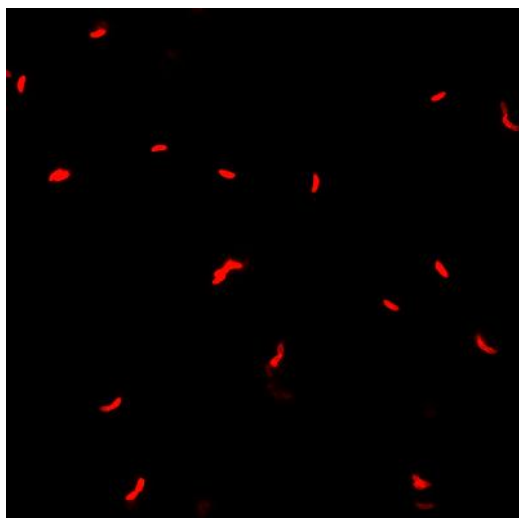


Figure 38: Microscopie à fluorescence de la souche WT-PstS-mCherry. Nous observons l'incorporation de *PstS-mCherry* dans les bactéries grâce à l'expression de la mCherry (en rouge). Nous pouvons observer qu'il y a plus de fluorescence au niveau du périmètre des cellules, ce qui est logique car le PstS est une protéine périplasmique.

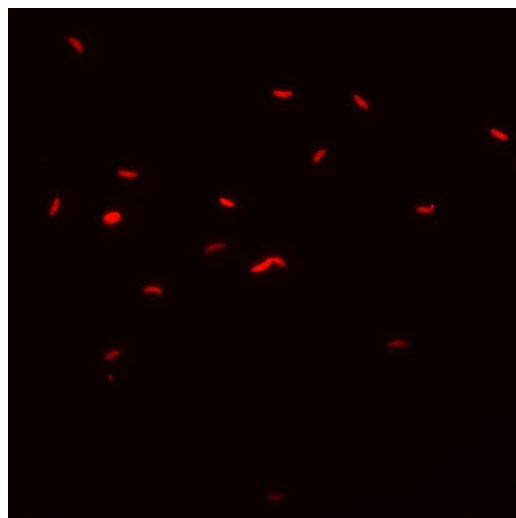


Figure 39: Microscopie à fluorescence de la souche Δ A1500-PstS-mCherry. Nous observons l'incorporation de *PstS-mCherry* dans les bactéries grâce à l'expression de la mCherry (en rouge). Nous pouvons observer qu'il y a plus de fluorescence au niveau du périmètre des cellules, ce qui est logique car le PstS est une protéine périplasmique.

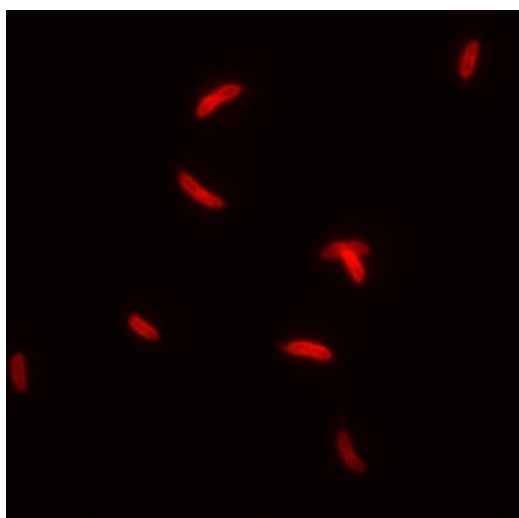


Figure 40: Microscopie à fluorescence de la souche Δ A1200-PstS-mCherry. Nous observons l'incorporation de *PstS-mCherry* dans les bactéries grâce à l'expression de la mCherry (en rouge). Nous pouvons observer qu'il y a plus de fluorescence au niveau du périmètre des cellules, ce qui est logique car le PstS est une protéine périplasmique.

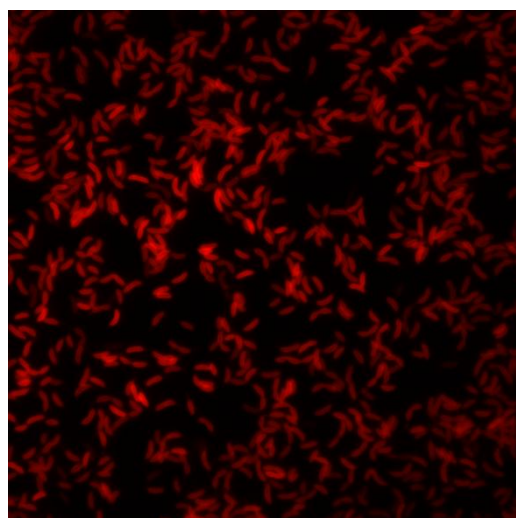


Figure 21: Microscopie à fluorescence de la souche Δ B-PstS-mCherry. Nous observons l'incorporation de *PstS-mCherry* dans les bactéries grâce à l'expression de la mCherry (en rouge). Nous pouvons observer qu'il y a plus de fluorescence au niveau du périmètre des cellules, ce qui est logique car le PstS est une protéine périplasmique.